

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2005 年 9 月 15 日 (15.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/085444 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/29, 15/84, A01H 1/00, 5/00,  
A01N 65/00, C07K 14/415, C12N 5/04, 5/10

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003451

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 2 日 (02.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2004-059551 2004 年 3 月 3 日 (03.03.2004) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立  
行政法人農業生物資源研究所 (NATIONAL INSTI-  
TUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP];  
〒3058602 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1-2 Ibaraki  
(JP). 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒  
3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 賀来 華江 (KAKU,  
Hanae) [JP/JP]; 〒3058602 茨城県つくば市観音台 2 丁  
目 1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内 Ibaraki  
(JP). 渋谷 直人 (SHIBUYA, Naoto) [JP/JP]; 〒2148571  
神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1 明治大学  
内 Kanagawa (JP). 南 栄一 (MINAMI, Eiichi) [JP/JP];  
〒3058602 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1-2 独  
立行政法人農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP). 南  
尚子 (MINAMI, Naoko) [JP/JP]; 〒3058602 茨城県つ  
くば市観音台 2 丁目 1-2 独立行政法人農業生物  
資源研究所内 Ibaraki (JP). 西澤 洋子 (NISHIZAWA,  
Yoko) [JP/JP]; 〒3058602 茨城県つくば市観音台 2 丁  
目 1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内 Ibaraki(JP). 瀧尾 擴士 (TAKIO, Koji) [JP/JP]; 〒6310033 奈良  
県奈良市あやめ池南 4 丁目 1-2 9 Nara (JP). 堂前 直  
(DOHMAE, Naoshi) [JP/JP]; 〒3510115 埼玉県和光市  
新倉 2 9 3 4-1-1 0 6 Saitama (JP).(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒  
3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル  
6 階 Ibaraki (JP).(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護  
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,  
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部  
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CHITIN OLIGOSACCHARIDE ELICITOR-BINDING PROTEIN

(54) 発明の名称: キチンオリゴ糖エリシター結合タンパク質

(57) Abstract: An elicitor-binding protein is efficiently isolated and purified by developing a column with the use of an APEA derivative and combining a precolumn for removing non-specifically adsorbed matters with an effective elution method. By using the N-terminal and inner chain amino acid sequences thus obtained, a cDNA encoding this protein can be successfully isolated from a rice cDNA library. By purifying anti-Con A-CEBiP antibody and examining effects on the formation of an elicitor-response activity enzyme, the formation of the activity enzyme is inhibited by pretreating with this antibody. Thus, it is indicated that this protein would be a receptor protein relating to the chitin oligosaccharide elicitor response. Since the elicitor induces blast-resistance in rice, this protein is applicable to the development of novel techniques for controlling disease injury.

(57) 要約: 本発明者らは、APEA誘導体を用いたカラムの開発、非特異的吸着物質除去のためのプレカラム、効果的な溶出法を組み合わせることで収率良くエリシター結合タンパク質を単離精製した。これにより得られた N 末端、及び内部鎖アミノ酸配列を利用して、イネ cDNA ライブラリーから本発明のタンパク質をコードする cDNA の単離に成功した。また、抗 Con A-CEBiP 抗体を精製し、エリシター応答性活性酸素生成に与える影響を調べたところ、該抗体で前処理することにより活性酸素生成は阻害され、本タンパク質がキチンオリゴ糖エリシター応答に関わる受容体タンパク質であることが示唆された。該エリシターは、イネにいち抵抗性を誘導するので、本発明のタンパク質は、新規な病害防除技術の開発に応用できる。

WO 2005/085444 A1

## 明 細 書

## キチンオリゴ糖エリシター結合タンパク質

## 技術分野

[0001] 本発明は、キチンオリゴ糖エリシターに結合するタンパク質に関する。

## 背景技術

[0002] エリシターによる植物の生体防御のシグナル伝達過程の分子機構を解明する上で、受容体分子の実体を明らかにすることは最重要課題の一つであるが、植物細胞の膜結合型受容体でリガンドとの対応関係を含めて明らかにされた例は極めて少ない。エリシター受容体に関しては、従来ダイズのグルカン系エリシター結合タンパク質が最も良く検討され、原形質膜のエリシター結合タンパク質をコードすると考えられるcDNAがクローニングされている。しかし、この場合にもこのcDNAから想定されるタンパク質の構造が一般的な受容体様の構造をしていないこともあって、シグナル伝達過程でどのような機能を担っているか、まだ不明の点が多い。最近、分子遺伝学的手法によりフラジェリンエリシター受容体と想定される受容体キナーゼ遺伝子(FLS2)が単離されているが、この遺伝子産物そのものがエリシターに結合するかどうかは未確定である。その他のものに関しては、結合タンパク質が同定されているものすら限られており、キチン系エリシターに関しては本発明者らの研究以外にはその実体に関する報告は無い。

[0003] 本発明者らは、これまで糸状菌細胞壁の構成多糖であるキチンの特定サイズの断片が、nMオーダーという低濃度でイネ培養細胞のファイトアレキシン合成、膜の脱分極、イオンの流入・流出、タンパク質のリン酸化、活性酸素の生成、ジャスモン酸合成、キチナーゼやPAL(フェニルアラニンアンモニアリアーゼ)等の遺伝子発現を引き起こすことを明らかにしてきた(非特許文献1〜6参照)。また、このエリシターの脱アセチル体であるキトサンオリゴ糖及び重合度5以下のキチンオリゴ糖では、これらの細胞応答のレベルが低下することも示した。これらの事実は、イネ培養細胞には、キチンオリゴ糖のサイズと構造を厳密に認識する受容体が存在することを示している。本発明者らは、<sup>125</sup>I標識したキチンオリゴ糖を用いた実験から、イネの原形質膜画分に

高親和性のエリシター結合タンパク質が存在し、生化学的な解析から、培養細胞に対するエリシター活性とよく対応した結合特異性を持つことも確認している(非特許文献7～9参照)。

[0004] なお、本願発明に関する先行技術文献を以下に示す。

非特許文献1:Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O. and Akatsuka, T.: Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by

N-acetylchitooligosaccharides, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 405-409(1993)

非特許文献2:Minami, E., Kuchitsu, K., He, D.-Y., Kouchi, H., Midoh, N.,

Ohtsuki, Y. and Shibuya, N.: Two novel genes rapidly and transiently activated in suspension-cultured rice cells by treatment with N-acetylchitoheptaose, a biotic elicitor for phytoalexin production. *Plant Cell Physiol.*, 37, 563 (1996)

非特許文献3:Kikuyama, M., Kuchitsu, K. and Shibuya, N.: Membrane depolarization induced by N-acetylchitooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell Physiol.* 38, 902-909 (1997)

非特許文献4:He, D.-Y., Yazaki, Y., Nishizawa, Y., Takai, R., Yamada, K., Sakano, K., Shibuya, N. and Minami, E. Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor,

N-acetylchitoheptaose. *Mol. Plant-Microbe. Interact.*, 11, 1167 (1998)

非特許文献5:R. Takai, K. Hasegawa, H. Kaku, N. Shibuya and E. Minami:Isolation and analysis of expression mechanisms of a rice gene, EL5, which shows structural similarity to ATL family from Arabidopsis, in response to

N-acetylchitooligosaccharide elicitor. *Plant Science*, 160, 577-583(2001)

非特許文献6:Yamaguchi, T., Minami, E. and Shibuya, N.: Activation of phospholipases by N-acetylchitooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells mediates reactive oxygen generation, *Physiol. Plant.*, 118, 361-370, (2003)

非特許文献7:Shibuya, N., Kaku, H., Kuchitsu, K., and Maliarik, M.J.: Identification of a novel high-affinity binding site for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the membrane fraction from suspension-cultured rice cells. *FEBS Lett.*, 329,

75-78(1993)

非特許文献8: Shibuya, N., Ebisu, N., Kamada, Y., Kaku, H., Cohn, J. and Ito, Y.:

Localization and binding characteristics of a high-affinity binding site for N-acetylchitooligosaccharide in the plasma membrane from suspension-cultured rice cells suggest a role as a receptor for the elicitor signal at the cell surface. Plant Cell Physiol., 37, 894-898(1996)

非特許文献9: Ito, Y., Kaku, H. and Shibuya N. : Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. The Plant Journal, 12(2), 347-356 (1997)

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明は、キチンオリゴ糖エリシターに結合するタンパク質、及びその利用方法の提供を課題とする。

### 課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意研究を行った。キチンオリゴ糖エリシター結合タンパク質を、キチンオリゴ糖エリシターへの結合活性を保持したまま、キチンオリゴ糖鎖を固定化したカラムにより精製する方法に関しては、膜タンパク質の可溶化条件の設定、非特異的吸着タンパク質などの混入を防ぐためのプレカラムの工夫、吸着容量・回収率を高めるための親和性担体のデザインと溶出条件の設定などに種々の検討を必要とした。具体的には、Triton X-100 による原形質膜タンパク質の可溶化、APEA誘導体 ((GlcNAc)<sub>8</sub>-APEA (aminophenylethylamino)誘導体)を用いたカラムの開発、非特異的吸着物質除去のためのプレカラム、効果的な溶出法を組み合わせることで、収率良くエリシター結合タンパク質を単離精製した。次いで、N末端アミノ酸配列及び内部鎖アミノ酸配列を解読し、これらのアミノ酸配列情報に基づいて、イネcDNAライブラリーから本発明のタンパク質をコードするcDNAの単離に成功した。

- [0007] 本発明のタンパク質は糖タンパク質であり、Con Aレクチンに結合する。そこでCon

Aカラムに結合するイネ原形質膜画分に対する抗体を作成し、種々のクロマトグラフィーを工夫し、本目的タンパク質に対する抗体(抗Con A-CEBiP抗体)を精製した。抗Con A-CEBiP抗体がエリシター応答性活性酸素生成へ与える影響を調べたところ、抗Con A-CEBiP抗体で前処理することにより活性酸素生成は阻害され、本発明のタンパク質がキチンオリゴ糖エリシター応答に関わる受容体タンパク質であることが示唆された。CEBiP遺伝子の発現をRNAi法で特異的にノックダウンさせた形質転換イネ細胞に対する糖エリシター処理の結果、活性酸素の生成が抑制されたことから、本発明のタンパク質がキチンオリゴ糖エリシター応答に関わる受容体タンパク質であることが示唆された。また、マイクロアレイ解析により、イネ培養細胞においてキチンオリゴ糖エリシターに応答する遺伝子のうち、7割強の遺伝子がCEBiPの発現量を低下させることによって応答性を失うことから、CEBiPはキチンオリゴ糖エリシターの受容体タンパク質であり、エリシターシグナル伝達において重要な役割をもつタンパク質であることが確認された。

[0008] 即ち、本発明は、以下の[1]～[16]を提供するものである。

[1] 以下の(a)～(d)のいずれかに記載の、キチンオリゴ糖エリシターに対して結合活性を有する植物のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号:1または3に記載の塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号:1または3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNA

(c) 配列番号:2または4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(d) 配列番号:2または4に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

[2] 植物がイネである、[1]に記載のDNA。

[3] [1]または[2]に記載のDNAによりコードされるタンパク質。

[4] [1]または[2]に記載のDNAを含むベクター。

[5] [1]もしくは[2]に記載のDNA、または[4]に記載のベクターを保持する形質転換植物細胞。

[6] [5]に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体。

[7]イネ由来である、[6]に記載の形質転換植物体。

[8][6]または[7]に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。

[9][6]～[8]のいずれかに記載の形質転換植物体の繁殖材料。

[10][6]～[8]のいずれかに記載の形質転換植物体の製造方法であって、[1]もしくは[2]に記載のDNA、または[4]に記載のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法。

[11][1]もしくは[2]に記載のDNA、または[4]に記載のベクターを含有する、植物の病害防除に用いる薬剤。

[12]植物がイネである、[11]に記載の薬剤。

[13]病害がいもち病である、[12]に記載の薬剤。

[14][3]に記載のタンパク質を植物体の細胞内で発現させることを特徴とする、植物の病害防除方法。

[15]植物がイネである、[14]に記載の方法。

[16]病害がいもち病である、[15]に記載の方法。

#### 図面の簡単な説明

[0009] [図1]イネ培養細胞からのキチンエリシター結合タンパク質の精製を示す図及び写真である。

[図2]抗Con A-CEBiP抗体の精製方法を示す図である。

[図3]アフィニティーラベルしたCon Aに結合するイネ原形質膜画分の2次元SDS-PAGEの結果を示す写真である。

[図4]活性酸素生成における抗CEBiP抗体又は抗血清の効果を示すグラフである。

[図5]ペプチドシーケンサーから得たN末端32残基アミノ酸配列を示す図である。

[図6]オリゴキチン結合タンパク質のクローニングの概略図である。

[図7]イネ由来キチンエリシター結合タンパク質のcDNAを示す図である。図中の塩基配列を配列番号:5、アミノ酸配列を配列番号:6に示す。

[図8]ゲノミックサザンブロット分析の結果を示す写真である。

[図9]キチンエリシター結合タンパク質の配列とゲノムDNAの配列の照合結果を示す

図である。

[図10]可溶化培養細胞における(GlcNAc)<sub>7</sub>のCEBiPの発現への影響を示す写真である。

[図11]MALDI TOF-MS によるCEBiPの分子量の測定結果を示す図である。

[図12]TFMSによるCEBiPの糖鎖除去を示す写真である。

[図13]CEBiP-RNAiベクター中のCEBiP遺伝子断片の塩基配列を示す図である。

[図14]非形質転換及び形質転換イネ細胞におけるCEBiP遺伝子のタンパク質及びRNAレベルの発現解析写真である。

[図15]エリシターによる非形質転換体及びCEBiP-RNAiイネ細胞の活性酸素の生成を示すグラフである。

[図16]エリシター処理による非形質転換体及びCEBiP-RNAiイネ細胞の活性酸素の生成を示すグラフである。

[図17](A) 非形質転換体及びCEBiP-RNAi #6イネ細胞における、エリシター処理で発現量が増加及び減少する遺伝子数を示すグラフである。(B) CEBiP遺伝子のノックダウンにより顕著に抑制された遺伝子の機能別分類グラフである。

### 発明を実施するための最良の形態

[0010] 本発明者らは、植物におけるキチンオリゴ糖エリシター結合タンパク質(CEBiP)を高い収率で単離精製し、該遺伝子配列を解読した。

[0011] 本発明は、以下の(a)ー(d)のいずれかに記載の、キチンオリゴ糖エリシターに対して結合活性を有する植物のタンパク質をコードするDNA、および、該DNAによりコードされるタンパク質を提供する。

(a) 配列番号:1または3に記載の塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号:1または3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNA

(c) 配列番号:2または4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(d) 配列番号:2または4に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

[0012] 本発明における上記植物としては、特に限定されず、例えば、穀類、野菜、および

果樹等の有用農作物、観葉植物等の鑑賞用植物等が挙げられる。具体的には、該植物として、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ナタネ、ダイズ、ワタ、ニンジン、トマト、ジャガイモ、キク、バラ、カーネーション、シクラメン、シロイヌナズナ等を例示することができる。本発明の上記植物としては、好ましくはイネを挙げることができる。

[0013] 本発明のエリシター結合タンパク質のcDNAの塩基配列を配列番号:1に、該cDNAによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号:2に示す。また、上記cDNAからシグナルペプチドをコードする部分を除いたDNAの塩基配列を配列番号:3、該DNAによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号:4に示す。本発明のタンパク質は、内部に4種類の配列(配列表の配列番号:4の139番目から152番目までの配列、154番目から161番目までの配列、164番目から176番目までの配列、及び177番目から182番目までの配列)を有する。

[0014] 本発明のDNAは、当業者においては、一般的に公知の方法により単離することが可能である。例えば、ハイブリダイゼーション技術(Southern, EM., J Mol Biol, 1975, 98, 503.)やポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術(Saiki, RK. et al., Science, 1985, 230, 1350., Saiki, RK. et al., Science 1988, 239, 487.)を利用する方法が挙げられる。すなわち、配列番号:1または3に記載の塩基配列からなるDNAもしくはその一部をプローブとして、また配列番号:1または3に記載の塩基配列からなるDNAに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、他の植物から配列番号:1または3に記載の塩基配列からなるDNAと高い相同性を有するDNAを単離することは、当業者にとって通常行い得ることである。このように、ハイブリダイゼーション技術やPCR技術によって単離し得る、配列番号:1または3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAもまた、本発明のDNAに含まれる。

[0015] このようなDNAを単離するためには、好ましくは低ストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーション反応を行う。本発明において低ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件(穏やかなハイブリダイゼーション条件)とは、5X SSPE、1% SDS(W/V)、0.1% BSA、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール400、100  $\mu$  g/ml 変性サケ精巢DNA、またはこれと同等のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を指す。また、高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件、例えば、25% ホルムアミド(V/V)、5X



SSPE、1% SDS(W/V)、0.1% BSA、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール400、100  $\mu$ g/ml 変性サケ精巢DNAの条件下では、より相同性の高いDNAを単離できることが期待される。こうして単離されたDNAは、アミノ酸レベルにおいて、配列番号:2または4に記載のアミノ酸配列と高い相同性を有すると考えられる。高い相同性とは、アミノ酸配列全体で少なくとも35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%以上の配列の同一性を指す。

[0016] アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズムBLAST(Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 1990, 87, 2264-2268.、Karlin, S. & Altschul, SF., Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 1993, 90, 5873.)を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul, SF. et al., J Mol Biol, 1990, 215, 403.)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

[0017] また、本発明は、本発明のエリシター結合タンパク質と構造的に類似しているタンパク質、および該タンパク質をコードするDNAも提供する。このようなタンパク質をコードするDNAとしては、該タンパク質において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAが挙げられる。例えば、本発明のエリシター結合タンパク質のホモログであって、糖鎖結合可能なサイト(NXT(S))を有し、LysMドメインを有する糖タンパク質をコードするDNAが例示できる。

[0018] 上記のDNAを調製するために、当業者によく知られた方法としては、上記ハイブリダイゼーション技術(Southern, EM., J Mol Biol, 1975, 98, 503.)やポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術(Saiki, RK. et al., Science, 1985, 230, 1350.、Saiki, RK. et al., Science, 1988, 239, 487.)の他に、例えば、該DNAに対し、site-directed mutagenesis法(Kramer, W. & Fritz, HJ., Methods Enzymol, 1987, 154, 350.)により変異を導入

する方法が挙げられる。改変されるアミノ酸の数は、改変後のタンパク質が、本発明のエリシター結合タンパク質と構造的に類似している限り、特に制限はないが、一般的には、50アミノ酸以内、好ましくは30アミノ酸以内、より好ましくは10アミノ酸以内（例えば、5アミノ酸以内、3アミノ酸以内）である。アミノ酸の改変は、好ましくは保存的置換である。改変前と改変後の各アミノ酸についてのhydropathic index (Kyte and Doolittle, (1982) J Mol Biol. 1982 May 5;157(1):105-32) やHydrophilicity value (米国特許第4,554,101号)の数値は、 $\pm 2$ 以内が好ましく、さらに好ましくは $\pm 1$ 以内であり、最も好ましくは $\pm 0.5$ 以内である。また、自然界においても、塩基配列の変異によりコードするタンパク質のアミノ酸配列が変異することは起こり得ることである。また、塩基配列が変異していても、その変異がタンパク質中のアミノ酸の変異を伴わない場合（縮重変異）があり、このような縮重変異DNAも本発明に含まれる。

[0019] 本発明のDNAには、ゲノムDNA、cDNA、および化学合成DNAが含まれる。ゲノムDNAおよびcDNAの調製は、当業者にとって常套手段を利用して行うことが可能である。ゲノムDNAは、例えば、上記の植物のエリシター結合タンパク質をコードする遺伝子を有する植物からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリー（ベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC、PAC等が利用できる）を作成し、これを展開して、該タンパク質をコードするDNAを基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより調製することが可能である。また、上記のエリシター結合タンパク質をコードするDNAに特異的なプライマーを作成し、これを利用したPCRを行うことにより調製することも可能である。また、cDNAは、例えば、該タンパク質をコードする遺伝子を有する植物から抽出したmRNAを基にcDNAを合成し、これを $\lambda$  ZAP等のベクターに挿入してcDNAライブラリーを作成し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより、また、PCRを行うことにより調製することが可能である。

[0020] なお、本発明のDNAのうち天然由来のものは、キチンオリゴ糖エリシターにより誘導される。よって、本発明のDNAの誘導を指標に、被検植物体あるいは被検植物細胞に生体防御機構が作動しているか否かを判定できる。

- [0021] 本発明のDNAは、その発現制御により表現型が改変された形質転換植物体の作出などに利用することが可能である。また、本発明のDNAは、例えば、組み換えタンパク質の調製に利用できる。エリシターは植物の生体防御のシグナル伝達過程の分子機構の研究において、重要な物質である。
- [0022] 組み換えタンパク質を調製する場合には、通常、本発明のDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、形質転換細胞を培養して発現させたタンパク質を精製する。組み換えタンパク質は、精製を容易にするなどの目的で、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることも可能である。例えば、大腸菌を宿主としてマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として調製する方法（米国New England BioLabs社発売のベクターpMALシリーズ）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として調製する方法（Amersham Pharmacia Biotech社発売のベクターpGEXシリーズ）、ヒスチジンタグを付加して調製する方法（Novagen社のpETシリーズ）などを利用することが可能である。宿主細胞としては、組み換えタンパク質の発現に適した細胞であれば特に制限はなく、上記の大腸菌の他、発現ベクターを変えることにより、例えば、酵母、種々の動植物細胞、昆虫細胞などを用いることが可能である。宿主細胞へのベクターの導入には、当業者に公知の種々の方法を用いることが可能である。例えば、大腸菌への導入には、カルシウムイオンを利用した導入方法（Mandel, M. & Higa, A., Journal of Molecular Biology, 1970, 53, 158-162., Hanahan, D., Journal of Molecular Biology, 1983, 166, 557-580.）を用いることができる。宿主細胞内で発現させた組み換えタンパク質は、該宿主細胞またはその培養上清から、当業者に公知の方法により精製し、回収することができる。組み換えタンパク質を上記のマルトース結合タンパク質などとの融合タンパク質として発現させた場合には、容易にアフィニティー精製を行うことが可能である。このようにして作製される本発明のDNAによってコードされるタンパク質もまた、本発明に含まれる。
- [0023] 本発明のタンパク質は、植物培養細胞の原形質膜から単離精製することもできる。本発明には、以下の工程によって精製されるタンパク質も含まれる。
- (1) 界面活性剤により原形質膜タンパク質を可溶化する工程

- (2) (1) で得られた可溶化画分中のキチンオリゴ糖エリシター結合タンパク質を  
(GlcNAc)<sub>8</sub>-APEA誘導体に結合させる工程  
(3) (2) で結合したタンパク質を溶出させる工程

[0024] このようなタンパク質は、N末端に配列表の配列番号:4の1番目から32番目までの配列を有し、内部に4種類の配列(配列表の配列番号:4の139番目から152番目までの配列、154番目から161番目までの配列、164番目から176番目までの配列、及び177番目から182番目までの配列)を有する糖タンパク質である。より具体的には、可溶化した原形質膜を、カラム操作においてチューブやカラムのガラス表面に非特異的吸着での損失を防ぐために、あらかじめOVA(卵白アルブミン)を流した3種類のカラムにかける(プレカラム)。1、2本目のカラムはセファロースゲル担体やデキストランに吸着する物質を除去するために用い、3本目のカラムで目的の本発明のタンパク質を吸着する。ただし、プレカラムは上記2本に限定されるわけではない。目的のタンパク質を吸着するためのカラムには、キチンオリゴ糖をそのまま固定化するのではなく、(GlcNAc)<sub>8</sub>-APEA(aminophenylethylamino)誘導体を用いることにより吸着容量が大幅に向上したカラムを使用する。次いで、カラムから本発明のタンパク質を溶出させる。目的タンパク質の精製度を上げるために、溶出前に非エリシター糖(結合様式と構造がキチンオリゴ糖に似ているが活性がない糖)でカラムを洗浄してから、目的タンパク質をカラムから溶出させる。上記の単離精製法を用いることで、従来よりも高い精製度で多量のエリシター結合タンパク質を得ることが可能になる。

[0025] 本発明のタンパク質を用いることにより、これに結合する抗体を調製することも可能である。例えば、ポリクローナル抗体は、精製した本発明のタンパク質若しくはその一部のペプチドをウサギなどの免疫動物に免疫し、一定期間の後に血液を採取し、血ペいを除去した血清より調製することが可能である。また、モノクローナル抗体は、上記タンパク質若しくはペプチドで免疫した動物の抗体産生細胞と骨腫瘍細胞とを融合させ、目的とする抗体を産生する単クローン細胞(ハイブリドーマ)を単離し、該細胞から抗体を得ることにより調製することができる。これにより得られた抗体は、本発明のタンパク質の精製や検出などに利用することが可能である。本発明には、本発明のタンパク質に結合する抗体が含まれる。また、本発明の抗体には、抗血清、

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびこれら抗体の断片が含まれる。

[0026] また本発明は、上記DNAまたは核酸を含むベクター、該ベクターを保持する形質転換植物細胞、該形質転換植物細胞を含む形質転換植物体、該形質転換植物体の子孫またはクローンである形質転換植物体、および該形質転換植物体の繁殖材料を提供する。本発明の植物体は、本発明のタンパク質を生産するために利用できる。また、該植物体は、いもち病などの病害を防除する機能を有する。

[0027] 本発明のDNAを発現する形質転換植物体を作製する場合には、本発明のDNAを適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させる。

[0028] さらに、本発明は、上記の形質転換植物体の製造方法であって、本発明のDNAまたは核酸、あるいは本発明のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法を提供する。

[0029] 本発明のDNAまたは核酸の植物細胞への導入は、当業者においては、公知の方法、例えばアグロバクテリウム法、電気穿孔法(エレクトロポレーション法)、パーティクルガン法により実施することができる。

[0030] 上記アグロバクテリウム法を用いる場合、例えばNagelらの方法(Microbiol. Lett., 1990, 67, 325.)が用いられる。この方法によれば、組み換えベクターをアグロバクテリウム細菌中に形質転換して、次いで形質転換されたアグロバクテリウムを、リーフディスク法等の公知の方法により植物細胞に導入する。上記ベクターは、例えば植物体に導入した後、本発明のDNAが植物体中で発現するように、発現プロモーターを含む。一般に、該プロモーターの下流には本発明のDNAが位置し、さらに該DNAの下流にはターミネーターが位置する。この目的に用いられる組み換えベクターは、植物への導入方法、または植物の種類に応じて、当業者によって適宜選択される。上記プロモーターとして、例えばカリフラワーモザイクウイルス由来のCaMV35S、トウモロコシのユビキチンプロモーター(特開平2-79983号公報)等を挙げることができる。

[0031] また、上記ターミネーターは、カリフラワーモザイクウイルス由来のターミネーター、あるいはノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーター等を例示することができるが、植物体中で機能するプロモーターやターミネーターであれば、これらに限定されな

い。

- [0032] また、本発明のDNAまたは核酸を導入する植物は、外植片であってもよく、これらの植物から培養細胞を調製し、得られた培養細胞に導入してもよい。本発明の「植物細胞」は、例えば葉、根、茎、花および種子中の胚盤等の植物細胞、カルス、懸濁培養細胞等が挙げられる。
- [0033] また、本発明のDNAまたは核酸の導入により形質転換した植物細胞を効率的に選択するために、上記組み換えベクターは、適当な選抜マーカー遺伝子を含む、もしくは選抜マーカー遺伝子を含むプラスミドベクターと共に植物細胞へ導入するのが好ましい。この目的に使用する選抜マーカー遺伝子は、例えば抗生物質ハイグロマイシンに耐性であるハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、カナマイシンまたはゲンタマイシンに耐性であるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、および除草剤ホスフィノスリシンに耐性であるアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等が挙げられる。
- [0034] 組み換えベクターを導入した植物細胞は、導入された選抜マーカー遺伝子の種類に従って適当な選抜用薬剤を含む公知の選抜用培地に置床し培養する。これにより形質転換された植物培養細胞を得ることができる。
- [0035] 次いで、本発明のDNAまたは核酸を導入した形質転換細胞から植物体を再生する。植物体の再生は植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である(Toki. et al., Plant Physiol, 1995, 100, 1503-1507.)。例えばイネにおいては、形質転換植物体を作成する手法については、ポリエチレングリコールによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体(インド型イネ品種が適している)を再生させる方法(Datta, S K. et al., In Gene Transfer To Plants (Potrykus I and Spangenberg Eds.), 1995, 66-74.)、電気パルスによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体(日本型イネ品種が適している)を再生させる方法(Toki. et al., Plant Physiol, 1992, 100, 1503-1507.)、パーティクルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し、植物体を再生させる方法(Christou, et al., Bio/technology, 1991, 9, 957-962.)およびアグロバクテリウムを介して遺伝子を導入し、植物体を再生させる方法(Hiei. et al., Plant J, 1994, 6, 271-282.)等、いくつかの技術が既に確立し、本願発明の技術分野において広く用いられている。本発明においては、これらの方法を好適に用いることができる。

- [0036] 形質転換細胞から再生させた植物体は、次いで馴化用培地で培養する。その後、馴化した再生植物体を、通常の栽培条件で栽培すると、植物体が得られ、成熟して結実して種子を得ることができる。
- [0037] なお、このように再生され、かつ栽培した形質転換植物体中の導入された外来DNAまたは核酸の存在は、公知のPCR法やサザンハイブリダイゼーション法によって、または植物体中の核酸の塩基配列を解析することによって確認することができる。この場合、形質転換植物体からのDNAまたは核酸の抽出は、公知のJ.Sambrookらの方法(Molecular Cloning, 第2版, Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989)に準じて実施することができる。
- [0038] 再生させた植物体中に存在する本発明のDNAよりなる外来遺伝子を、PCR法を用いて解析する場合には、上記のように再生植物体から抽出した核酸を鋳型として増幅反応を行う。また、本発明の核酸がDNAである場合には、該DNAの塩基配列に従って適当に選択された塩基配列をもつ合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、これらを混合させた反応液中において増幅反応を行うこともできる。増幅反応においては、DNAの変性、アニーリング、伸張反応を数十回繰り返すと、本発明のDNA配列を含むDNA断片の増幅生成物を得ることができる。増幅生成物を含む反応液を、例えばアガロース電気泳動にかけると、増幅された各種のDNA断片が分画されて、そのDNA断片が本発明のDNAに対応することを確認することが可能である。
- [0039] 一旦、染色体内に本発明のDNAが導入された形質転換植物体 that 得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料(例えば種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等)を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。
- [0040] 本発明は、植物の病害防除のための薬剤を提供する。本明細書において、植物の病害防除とは、病原菌や害虫などの病原体の侵入に対する植物の自己防御反応を増強させる機能を意味する。具体的には、植物が病害を受けた際に起こす、膜の脱分極、活性酸素の生成、ファイトアレキシン等の抗菌物質の合成等の機能をいう。
- [0041] 病害としては、紋枯病、コムギ黒変病、オオムギ斑点病、イネごま葉枯病が挙げられ

るが、好ましくは、イネいもち病である。

[0042] 本発明の薬剤とは、本発明のDNAまたはベクター自体、または、本発明のDNAまたはベクターを含有する組成物のことである。前記において、「組成物」は種々の物質を含有することができる。そのような物質は、該組成物が本発明の目的を達成することができるものであれば特に限定はないが、例えば、該DNAまたはベクターが安定的に存在するための物質、該DNAまたはベクターの植物細胞内への導入を補助する物質、該DNAやベクターの計量を容易にする増量のための物質等を挙げることができる。

[0043] 本発明はまた、本発明のタンパク質を植物体の細胞内で発現させることを特徴とする、植物の病害防除方法を提供する。タンパク質等を植物体の細胞内で発現させる方法は、上述のとおりである。

[0044] さらに本発明は、本発明のDNAに対するアンチセンスDNAを提供する。このようなアンチセンスDNAを含むベクターを植物細胞に導入することで、本発明のタンパク質の発現を特異的にノックダウンさせた形質転換植物細胞を作製することができる。作成された形質転換植物細胞は、本発明のタンパク質の機能の分析に利用することができる。

[0045] なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

## 実施例

[0046] 以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、実施例は、下記の材料および方法に従って実施した。

### 1. 培養細胞及び原形質膜の調製

イネ培養細胞(*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) はN6培地を改変したL培地(Kuchitsu, K., Kikuyama, M., and Shibuya, N. Protoplasma, 174, 79-81(1993))を用い、インキュベータ中にて25℃、暗所、150 rpmの振盪条件下で行い、振盪培養により継代維持・増殖を行い実験に用いた。

[0047] イネ培養細胞は2週に1回、滅菌した1 mm角の金網上で裏ごし、細かくした細胞塊



を継代にした。なお、各実験においては、この裏ごしすることによる刺激の影響を考慮して、この処理をしてから4日以上経過したものを用いた。

- [0048] イネ培養細胞から原形質膜の調製は、渋谷らの方法 (Shibuya, N., Ebisu, N., Kamada, Y., Kaku, H., Cohn, J. and Ito, Y. Plant Cell Physiol., 37, 894-898(1996)) に従って分画遠心分離法により得たミクロソーム画分(microsomal fraction:MF)を、デキストラン／ポリエチレングリコールを用いた水性2層分配法により分画して調製した。得られた原形質膜画分は1-2 mlのPMバッファーに懸濁し、超音波処理で均一にしたのち、-80℃で保存した。

[0049] 2. エリシター糖及びその誘導体

エリシターとして用いたキチンオリゴ糖((GlcNAc)<sub>n</sub>)の6量体以下のものは生化学工業株式会社製のfine grade標品を用い、7量体および8量体は焼津水産化学工業より譲渡されたカニ甲殻由来のキトサンオリゴ糖7量体および8量体をそれぞれ再アセチル化することにより調製した。

- [0050] (GlcNAc)<sub>8</sub>-APEA誘導体及び(GlcNAc)<sub>8</sub>-APEAへの放射性ヨウ素<sup>125</sup>Iの導入は、伊藤らの方法 (Ito, Y., Kaku, H. and Shibuya N. The Plant Journal, 12(2), 347-356 (1997)) に従った。

[0051] 3. アフィニティラベリング

グルタルアルデヒドによるエリシター結合タンパク質アフィニティラベリングは、<sup>125</sup>I-(GlcNAc)<sub>8</sub>-APEA誘導体のアミノ基とタンパク質側鎖のアミノ基同士がNaCNBH<sub>3</sub>を触媒としてグルタルアルデヒドを介して架橋するものであり、伊藤らの方法 (Ito, Y., Kaku, H. and Shibuya N. The Plant Journal, 12(2), 347-356 (1997)) に従って行った。

- [0052] イネの原形質膜、可溶化原形質膜画分或いは精製したCEBiP画分と100 nM (30 pmol) APEA誘導体を(液量250 μl) 氷中で1時間反応させ、30 μgのNaCNBH<sub>3</sub>を含む30 μlの2.5%グルタルアルデヒド溶液を加え、室温で30分反応させた。反応後、25 μlの5 M NaCl及び1.2 ml MeOHを加え、一晚-80℃にて放置したのち、遠心分離(15,000 rpm、2時間)を行い、沈殿画分をSDS電気泳動に供した。SDS電気泳動は、Multiphor IIマルチパーパス電気泳動装置によるプレキャスト型のポリアクリルアミド濃

度8-18%グラジエントゲル(Pharmacia)を用いて、あるいはスラブゲル用電気泳動装置で、ポリアクリルアミド濃度10%,15%もしくは5-20%のグラジエントゲル(PAGEL、ATTO)で行った。泳動後にゲルを50%メタノール/10%酢酸水溶液中で30分間固定化处理し風乾したゲル、あるいはゲル内のタンパク質をPVDFメンブレン(Millipore イモビロン-PSQ トランスファーメンブレン)に転写したのち、バイオイメーシングプレートに2-7日間感光させた。プレートをイメーシングプレートリーダー及びバイオイメーシングアナライザー(BAS 2000、富士フィルム)で解析し、放射性ラベルされたタンパク質を検出した。

[0053] (実施例1)キチンエリシター結合タンパク質の精製とアミノ酸配列の解析

CEBiPタンパク質精製に用いたアフィニティーカラムは(GlcNAc)<sub>8</sub>-APEA誘導体(75 mg)及びグリシンをそれぞれActivated CH-Sepharose 4Bゲル担体(乾燥ゲル5 g)にファルマシア社付属マニュアルに従って固定化することにより調製した。

[0054] CEBiPの精製は、以下のように行った。原形質膜画分(20.46 mg)を0.5% Triton X-100を含むTBSバッファー(2mM DTT、1mM PMSF、0.15M NaCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、25mM Tris-HCl buffer (pH 7.0))で4℃、1時間反応させた後、卓上超遠心機(4℃、70,000 rpm、1時間)にて得られた上清を可溶化原形質膜画分とした。

[0055] イネ培養細胞原形質膜からのエリシター結合蛋白質の可溶化には、TritonX-100やn-dodecyl-β-maltoside等の界面活性剤が有効であった。0.5%濃度のTriton X-100により60%の原形質膜タンパク質が可溶化され、<sup>125</sup>Iラベルしたエリシター誘導体との結合実験から、エリシター結合タンパク質の約30%が活性型として回収された。可溶化画分中の結合活性は、原形質膜を用いて得られた結果とよく対応する結合特性を示し、親和性標識の結果からも目的とするエリシター結合タンパク質が活性を保持して可溶化されたことが確認された。

[0056] この画分を連結した3本のカラム(Aカラム:Sephadex G-75 (15 ml);Bカラム: Glycine-CH-Sepharose 4B (10 ml);Cカラム:(GlcNAc)<sub>8</sub>-APEA-CH-Sepharose4B (11 ml))に供した(図1)。微量な精製タンパク質がシリコンチューブやカラムのガラス表面に非特異的吸着で損失することを防ぐために、予め、連結カラム及びチューブ等を1% 卵白アルブミン(OVA)次いで、0.17 M Glycine-HCl bufferで洗浄後、0.005%

Triton X-100を含むTBS バッファーで平衡化した。次に、可溶化した原形質膜画分を、セファロースゲル担体やデキストランに吸着する物質を除去するために目的カラム(Cカラム)の前に2本のカラム(Aカラム、Bカラム)を付けた、連結カラムで分画した。Cカラムには高吸着容量の新しい親和性クロマト用担体として(GlcNAc)<sub>8</sub>-APEA (aminophenylethylamino)誘導体を用いた。次いで、未吸着物質を除くためカラムをTBSバッファーで洗浄した。目的カラムであるCカラムを、非エリシター糖であるセロヘキサオース及びキトサンヘキサオース混合溶液(1 mg/ml、20 ml)で洗浄後、目的タンパク質を0.17 M Glycine-HCl buffer (pH 2.3)で溶出した。溶出画分は、1 M Tris溶液で直ちに中和し、全量を275  $\mu$  lとしたのち、各チューブに25  $\mu$  lの5 M NaCl及び1.2 ml MeOHを加え、-80°Cに一晩放置した。遠心分離により目的タンパク質を回収し、最終容量を80  $\mu$  lになるように溶かした。その1  $\mu$  lをMultiphor IIマルチパーパス電気泳動装置で、プレキャスト型のポリアクリルアミド濃度8-18%グラジエントゲル(Pharmacia)で電気泳動後、銀染色を行った。このように、APEA誘導体を用いたカラムと非特異的吸着物質除去のためのプレカラム、効果的な溶出法を組み合わせることで収率良く結合タンパク質を単離精製することができた。この方法で精製した画分にはMultiphor II電気泳動装置を用いたSDS電気泳動で75kDa、55kDaの2つのバンドが検出された(図1)。

[0057] 残りの精製タンパク質溶液は、ATTOの15%ポリアクリルアミドSDS電気泳動に供し、PVDF膜に転写、CBB染色後、目的タンパク質のバンドを切り出して、HP241プロテインシーケンサシステム(HEWLETT PACKARD)にてN末端アミノ酸配列の解析を行った。

[0058] 目的タンパク質の内部鎖解析は、以下の方法で行った。ゲルからバンドを切り出し、50  $\mu$  lの0.1% SDS、1 mM EDTA、0.1 M Tris-HCl(pH 9.0)に浸漬し、リジンに特異的なプロテアーゼ(リジルエンドペプチダーゼ、Achromobacter protease I)を加え、37°C一晩消化した。消化液をDEAE-5PW(1 x 20 mm; Tosoh, Tokyo)とMightysil RP-18(1 x 50 mm; Kanto Chemical, Tokyo)の連結カラムで分離した。溶媒として、Aには、0.085% TFA aq. Bには、0.075% TFA, 80% CH<sub>3</sub>CN. Aqを用い、1-12.5-60%B/1-10-86min. 20  $\mu$  l/minで溶出した。溶出ピークは、ペプチドシーケンサー及び

MALDI-TOF MSでアミノ酸配列解読及び質量分析を行った。その結果、精製目的タンパク質の32残基のN末端アミノ酸配列と、リシルエンドペプチダーゼ処理により4ヶ所の内部鎖アミノ酸配列が同定された。

[0059] SDS電気泳動で検出された75kDa、55kDaの2つのバンドはいずれも、<sup>125</sup>I標識した(GlcNAc)<sub>8</sub>-APEA誘導体で親和性標識され、N末端アミノ酸配列が同一であった。さらに、リジンを特異的に切断するプロテアーゼによるペプチドマップの解析から、低分子量のバンドは75kDaタンパク質のC末端側が精製中に内在性のプロテアーゼで部分分解されたものと考えられた。

[0060] 上述のように、キチンオリゴ糖をそのまま固定化するのではなく、APEA誘導体として固定化する方法の開発によりカラム担体の吸着容量が大幅に向上し、操作条件全体の検討と併せると初期の方法に比べ20倍近い収率の向上につながった。最終的に設定された条件下では、原形質膜に存在するエリシター結合タンパク質の約1.6%が回収されたものと推定される。この場合には精製過程で人為的にN末端アミノ酸残基を修飾することも無く、また、収率の向上もあって、32残基のN末端アミノ酸配列を解読できた。また、このことにより特定のペプチド分解酵素で特異的に切断されたペプチドを分離・精製し、その解析から4つの内部鎖アミノ酸配列を解読することができた。

[0061] (実施例2)抗Con A-CEBiP抗体の調製と精製

CEBiPは、コンカナバリンA(Con A)に結合する糖タンパク質である。そこでCon Aカラムに結合するイネ原形質膜画分に対する抗血清を作成し、種々のクロマトグラフィーを工夫し、本目的タンパク質を含む画分に対する抗血清(抗Con A-CEBiP抗体)を精製した。

[0062] 抗Con A-CEBiP抗血清の調製は以下の手順で行った。Con A-Sepharoseカラムを用いて、可溶化したイネ原形質膜画分中のCon Aに結合する全タンパク質を調製した。これを抗原として、ウサギを免疫し、抗Con A-bound fra. 抗血清を得た。

[0063] この抗血清を以下の方法で精製を行った(図2)。イネ原形質膜画分から(GlcNAc)<sub>7</sub>-Lys-Sepharoseを通過した画分及び非エリシター糖(キトサンヘキサオース及びセロヘキサオース)で溶出した画分をそれぞれ固定化したカラムを調製した。抗Con

A-bound fra. 抗血清を両カラムで分画し、抗Con A-CEBiP抗体を得た。

[0064] 抗Con A-CEBiP抗体の純度を確かめるために、Con Aカラムに結合したイネ原形質膜画分を<sup>125</sup>Iで標識したエリシター糖でアフィニティーラベルしたのち、2次元電気泳動に展開後、PVDF膜に転写した。転写膜上で抗Con A-CEBiP抗体を用いてWestern Bolttingを行った。その後、同膜上にある放射性ラベルされたタンパク質を、バイオイメージングアナライザー(BAS 2000、富士フィルム)で解析した。放射能ラベルされたタンパク質とWestern Boltting解析により発色したタンパク質が同一であるかどうかを確かめた。分子量スタンダードには、レインボータンパク質スタンダード(アマシヤム社)及びプレジジョンプロテインスタンダード(BIO-RAD)を用いた。

[0065] その結果、Western Bolttingで検出された3つのスポットのうち主要な2つは、放射性標識されていた(図3)。このことは、抗Con A-CEBiP抗体が、CEBiPに対して高度に精製されたことを示した。

[0066] (実施例3)抗血清による活性酸素生成応答の阻害解析

イネ培養細胞からプロトプラストを調製し、抗ConA-CEBiP抗体のエリシター応答性活性酸素生成への影響を調べた。

[0067] イネプロトプラストは以下の方法で調整した。

金網で裏ごし4日目のイネ培養細胞を2% Cellurase RS (Yaklt)及び0.05% Pectolyase Y-23を含む0.1%  $\text{CaCl}_2$ , 0.02% MES, 9% Mannitol溶液(pH 5.6) 14 ml 中で、30°C, 6時間穏やかに浸とうした。25  $\mu\text{m}$  ナイロンメッシュで細胞を濾過し、メッシュ上の細胞を20 mlのWashing buffer(0.1%  $\text{CaCl}_2$ /0.4 M Mannitol)で洗った(Nishimura, N., Tanabe, S., He, D.-Y., Yokota, T., Shibuya, N. and Minami, E. Plant Physiol. Biochem., 39, 1105-1110 (2001))。50 mlのファルコンチューブに集めたプロトプラストを600 rpm、5分間の遠心で回収した。Washing bufferを加え、数回プロトプラストを洗浄したのち、適当量のR2P培地に懸濁し、トーマ血球盤でプロトプラスト数を調べた。プロトプラストは、 $2 \times 10^6$  cells/mlに調整後、25°C、暗所にて一晩保温した。

[0068] イネプロトプラストにおける活性酸素の生成は、ルミノール法 (Schwacke, R. and Hager, A. Planta, 187, 136-141(1992))により行った。反応後の溶液は測定まで氷中

に保存した。ルミノール、フェリシアン化カリウムは50 mM カリウムリン酸バッファー pH 7.9を溶媒とした。フェリシアン化カリウムは使用直前に調製し、ルミノール溶液は低温で遮光保存していたものを使用前に室温に戻して用いた。

[0069] イネプロプラスト( $1 \times 10^6$  cells/500  $\mu$ l)を2 mlチューブに入れ、免疫前(Preimmune)抗血清或いは抗Con A-CEBiP抗体で30分間反応させた後、((GlcNAc)<sub>8</sub>、100  $\mu$ g/ml) 1  $\mu$ lあるいはR2P培地を加え15分間ゆっくり攪拌後、1000 rpm、1分間、遠心分離し、上清部を得た。また、同濃度のプロトプラストにR2P培地あるいは(GlcNAc)<sub>8</sub> 1  $\mu$ lを加えたものをコントロールとした。

[0070] チューブで反応後の溶液25  $\mu$ l、50 mMカリウムリン酸バッファー (pH 7.9) 400  $\mu$ l、1.1 mM ルミノール 25  $\mu$ l、14 mM フェリシアン化カリウム50  $\mu$ lを攪拌した後に、すばやくルミノメーター (Turner Design TD-20/20, Sunnyvael CA) にて10秒間化学発光カウントを測定した。 $H_2O_2$ 濃度は、市販 $H_2O_2$ 溶液 (30%  $H_2O_2$ 水溶液、和光純薬) による発光を測定し、標準曲線を作成して算出した。

[0071] プロトプラストにGlcNAcを添加すると、コントロールに比べて活性酸素の生成が1.7倍に増加した。この増加は、免疫前ウサギ血清では、阻害されないが、抗Con A-CEBiP抗体で前処理することによりほぼ完全に阻害された(図4)。

[0072] これらの結果は、本タンパク質がキチンオリゴ糖エリシターの受容体タンパク質であることを強く示唆するものであった。

[0073] (実施例4)イネcDNAライブラリー中のCEBiPのスクリーニング

イネ(日本晴)培養細胞からフェノール・SDS法とオリゴdT法でPolyA RNA(mRNA)を単離し、これを鋳型としてZAP-cDNA合成キット(STRATAGENE)にてイネ培養細胞cDNAライブラリーを調製した。

[0074] 本発明のタンパク質の遺伝子クローニングに関しては、いくつかのアプローチにより検討を行った。N末端アミノ酸15残基の配列に対する抗ペプチド抗体を作製し、抗体を高純度に精製したのち、イネ培養細胞cDNAライブラリーのスクリーニングを試みたが、目的タンパク質を含むクローンを単離することが出来なかった。その原因として第一に、15残基のアミノ酸配列情報では特異性が不十分であり、イネ培養細胞中にこの抗体と反応する他のタンパク質が(膜画分以外に)存在することが考えられる。精

製抗ペプチド抗体はマイクロゾーム画分及び原形質膜画分を用いる限りでは単一バンドを示す目的タンパク質とのみ反応したが、イネcDNAライブラリーをスクリーニングして得た陽性クローンは受容体とは異なる既知のタンパク質と類似した配列を持っていた。このほか、この方法では目的タンパク質が大腸菌中でシグナルペプチドを含んだ形で合成されるため、立体障害の問題からこの抗ペプチド抗体と反応することが困難である可能性も考えられる。

[0075] このほか、デジェネレーテッドオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、イネ培養細胞mRNAから作製した環状一本鎖DNAや、ゲノムDNAを鋳型にしてPCRを行う方法も検討したが、多くのバンドが増幅され、サブクローニングが困難であった。また、このオリゴヌクレオチドをプローブとして直接ライブラリーのスクリーニングを行う方法も試みたが、非特異的なスポットが多く見られ、陽性クローンの単離に至らなかった。

[0076] そこで、本発明者らは、イネ(日本晴)の使用頻度の高いコドンを組み合わせた7残基のN末端アミノ酸配列(<sup>14</sup>KSAILYT／配列番号:10(逆向き))に対応する上流向きプライマーを72種類合成し、イネ培養細胞cDNAライブラリーを鋳型とし、それぞれの合成プライマーとベクター上にある既知のプライマーでPCRを行った(図5、6)。合成プライマー(TGTAGAGGATGGCGGACTT／配列番号:11)とベクターのReverse primer(GGAAACAGCTATGACCATG／配列番号:12)でPCRを行なった結果、目的アミノ酸配列に対応するPCR増幅産物を得ることに成功した。得られたPCR断片をTAベクター(TA cloning kit, Invitrogen)にサブクローニングし、PCR断片の配列を解読した。このときに得られたPCR断片の大きさは280bpであり、翻訳されたタンパク質の配列は、シグナルペプチドの前の残基、Tからはじまり49アミノ酸残基であった。

[0077] 目的タンパク質のN末端アミノ酸配列に対応するDNAをプラスミドから切り出し、これをプローブとして、147bpのプローブでイネ培養細胞cDNAライブラリー(4 x 10<sup>5</sup> pfu)から目的遺伝子をスクリーニングした。

[0078] その結果、N末端アミノ酸配列が合致する3つのcDNAクローンを単離した。これら3種のクローンは、いずれも目的タンパク質のN末端アミノ酸配列と完全に一致する配列を含んでいた。このmRNAは、28アミノ酸残基のシグナルペプチド(M-28からA-1)及びC末端側に22アミノ酸残基の推定膜貫通領域(A307からL328)を含んでいた(

図7)。

[0079] (実施例5)ゲノミックサザンブロット分析

目的遺伝子のコピー数を調べるため、イネから単離したゲノムDNAを各種の制限酵素で処理、アガロースゲルによる電気泳動後、目的タンパク質をコードするDNAをプローブとして、ゲノミックサザンブロット分析を行った。その結果、数種の制限酵素処理したゲノムDNAでシングルバンドが検出され(図8)、目的とするエリシター結合タンパク質遺伝子はシングルコピーであることが示唆された。

[0080] このことはまた、目的タンパク質をコードするmRNAとN末端配列を共有する低分子量タンパク質をコードするものが、いずれもこの単一遺伝子からスプライシング等の差異によって生成する可能性を示唆している。

[0081] (実施例6)イネゲノムライブラリー中のCEBiPのスクリーニング

イネゲノムライブラリーをプローブ1(図7におけるA1からT181のアミノ酸配列部分に対応するDNA断片)でスクリーニングした結果、いくつかの陽性クローンを単離することができた。この中で、もっとも鎖長の長い陽性クローンからDNAを単離し、制限酵素で切断後、それぞれをプラスミドベクターに導入し、全長13,095bpの配列を決定した。この配列中には、目的タンパク質部分が完全にコードされていた。その後、イネゲノムデータベース検索から本発明者らが解析したゲノムDNAを含む遺伝子(AC099399)が見つかり、この遺伝子が第3染色体に座乗していることが確かめられた。このタンパク質の配列とゲノムDNA配列とを照合した結果、この部分のゲノムDNA配列には3箇所のイントロンが存在し(図9)、これらのイントロンのスプライシングによりCEBiPの成熟mRNAが合成されることが明らかとなった。

[0082] また、この目的遺伝子の発現は、キチンオリゴ糖エリシターにより誘導されることが確認された(図10)。

[0083] この目的遺伝子の翻訳産物の解析から、キチンエリシター結合タンパク質はC末端側にアミノ酸22残基からなる膜貫通領域を含むアミノ酸328残基からなり、分子量34640であった。また、11ヶ所の糖鎖結合可能なサイト(NXT(S))のうち、ペプチドシークエンス解析によりこれまで4ヶ所に糖鎖が付加していることが推測された。また、モチーフ検索から、ペプチドグリカン結合タンパク質に存在するLysMドメインが2ヶ所(図7



におけるY85～P131(配列表の配列番号:4の85番目から131番目までの配列)及びY149～P192(配列表の配列番号:4の149番目から192番目までの配列))あることが明らかになった。

[0084] この目的タンパク質の分子量は、最初に<sup>125</sup>I標識したエリシター糖によるアフィニティーラベルで得られた75kDaのタンパク質と分子量がかけ離れていた。すでに本発明者らは、Multiphor IIマルチパーパス電気泳動装置で、プレキャスト型のポリアクリルアミド濃度8-18%グラジエントゲル(Pharmacia)を用いた電気泳動では、目的タンパク質が7万5千に検出されるが、一方、ATTOのスラブ電気泳動装置を用いたものでは、6万5千から6万7千に検出されることを報告している(Okada, M., Matsumura, M., and Shibuya, N., J Plant Physiol. 158, 121-124 (2001))。これまで使用していたレインボータンパク質スタンダードは非常にブロードであり、より正確なリコンビナントタンパク質で調製された分子量スタンダードを使用すると、これまで65kDaから67kDaであった目的タンパク質は、分子量56kDaであった。さらに、より正確なCEBiPの分子量を測定するために、MALDI TOF-MS(Bruker ReFlex)を用いた。その結果、主として、40kDa及び35kDaの2つのピークを得た(図11)。これらの分子量の差は、CEBiPへの付加糖鎖の差によるものと考えられた。

[0085] (実施例7)TFMS処理によるCEBiP糖鎖の除去

遺伝子から算出される分子量と、電気泳動により推定した分子量の差は、糖鎖付加によるものかどうかを確かめるために、トリフルオロメタンスルホン酸(TFMS)によりイネ原形質膜タンパク質中の糖タンパク質の糖鎖を化学的に切断し、SDS-PAGEに続いてWestern Blottingを行ったのち、抗CEBiP抗血清による目的タンパク質の検出を行った。

[0086] 抗CEBiP抗血清は以下の方法で作製した。

まず、大腸菌大量発現系においてCEBiPを発現させた。具体的には、目的タンパク質から膜貫通領域を除いた領域に対応するcDNA断片をPCRで調製し、それをポリヒスチジン標識ベクターであるpET16bに挿入したのち、配列を確認した。該cDNA断片の塩基配列を配列番号:7に、cDNAをコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号:8に示す。これを大腸菌BL21に導入し、200 µg/mlのカルベニシリンを含むLB培

地中で37℃にて4時間半培養を行った。遠心分離により大腸菌を集め、同濃度のカルベニシリンを含むLB培地1mlに再懸濁させた後、50  $\mu$  lをカルベニシリン(最終濃度 500  $\mu$  g/ml)を含む8mlのLB培地に添加し3時間培養を行った。遠心分離により大腸菌を集め、カルベニシリン(最終濃度 500  $\mu$  g/ml)を含む8mlのLB培地に再懸濁させ、IPTG(最終濃度 1 mM)を加え、30℃、2時間培養を行ったのち、遠心分離(10000rpm、20℃)で菌体を回収し、-80℃にて保存した。

[0087] 次に、CEBiPを発現する菌体をPBSに懸濁したのち、ソニックで破碎し、遠心分離により沈殿画分を得た。この沈殿画分をSDS電気泳動を行った。発現タンパク質を含むゲルバンドを切り出し、PBSを加え、乳鉢で粉碎後、4℃で一晩攪拌し、目的タンパク質を抽出した。これを抗原として、ウサギに免疫を行い、抗CEBiP抗血清を得た。

[0088] TFMS処理および目的タンパク質の検出は以下の方法で行なった。

イネ原形質膜画分(20  $\mu$  g)をねじ口瓶に入れ、十分に乾燥させたのち、トリフルオロメタンスルホン酸(TFMS)50  $\mu$  lに溶解させ、0℃、1時間静置した。反応液に氷冷した1 M Tris を500  $\mu$  l加え中和したのち、チューブに275  $\mu$  lずつ分注し、27.5  $\mu$  lの5 M NaCl及び1.2 ml MeOHを加え、-80℃で、一晩放置後、遠心分離して、沈殿画分を得た。この沈殿画分をSDS電気泳動、Western Blottingに供し、抗CEBiP抗血清で目的タンパク質の検出を行った。

[0089] その結果、33kDa付近に陽性バンドが認められた(図12)。この分子量は、遺伝子から算出される値とよく一致していた。

[0090] 岡田らは、イネの葉や根の原形質膜にCEBiPと同一と考えられる結合タンパク質を見いだした(Okada, M., Matsumura, M., and Shibuya, N., J Plant Physiol. 158, 121-124 (2001))。キチンオリゴ糖がリグニン化を誘導することが報告されているコムギの葉から得た原形質膜においても同様のキチンオリゴ糖結合タンパク質が見いだされたが分子サイズは若干異なっていた。種々の植物の培養細胞を調べた結果、オオムギ、ニンジンなどの培養細胞の原形質膜に同様の結合タンパク質が見いだされた(Okada, M., Matsumura, M., Ito, Y., and Shibuya, N., Plant Cell Physiol., 43, 505-512 (2002))。これらのことは、こうしたキチン系エリシター認識系がイネに特有のものではなく、多くの植物に存在する進化的に保存されたものであることを示唆して

いる。

- [0091] 本遺伝子情報が明らかになることは、植物が病原菌由来のシグナル分子(エリシター)を認識し、細胞内・細胞間シグナル伝達経路を経て生体防御関連遺伝子の発現を誘導するメカニズムを明らかにすることが期待され、病害に強い作物の育種や新規な病害防除技術の開発に寄与することが考えられる。
- [0092] (実施例8) CEBiP遺伝子の発現量が抑制された形質転換イネの作製
- イネ細胞におけるCEBiPのキチンエリシター受容体としての機能を証明するために、CEBiP遺伝子の発現をRNAi法で特異的にノックダウンさせた形質転換イネ細胞をアグロバクテリウム法で作製した。形質転換用のバイナリーベクターはGateway system法を用いて構築した。まず、CEBiP遺伝子クローンを鋳型に、上流側プライマー(5'-CACCACAGAACAAGGGATGCCCCGT-3'／配列番号:14)および下流側プライマー(5'-GCTGGATAAACCAGTCATCAAAAT-3'／配列番号:15)、KOD-Plus DNAポリメラーゼ(TOYOBO社)を用いてPCRを行ない、385 bpのCEBiP遺伝子断片(図13／配列番号:13)を増幅した。これをpENTR/D-TOPO Cloning kit (Invitrogen社)を用いてエンタリーベクターにクローン化した(pENTR-CEBiP-RNAi)。
- [0093] pENTR-CEBiP-RNAiを制限酵素MboIIで処理した後、Gateway system用バイナリーベクターpANDA(奈良先端大学島本功教授より分譲、Miki D. & Shimamoto K. Plant cell physiology, 45,490-495, 2004)と混合し、Gateway LR Clonase Enzyme Mix (Invitrogen社)を用いて、CEBiP遺伝子断片がGUS遺伝子断片をはさんで逆向きに2反復導入されたバイナリーベクターpANDA-CEBiP-RNAiを構築した。
- [0094] pANDA-CEBiP-RNAiをエレクトロポレーション法で導入したAgrobacterium tumefaciens EHA105株を用いて、イネ超迅速形質転換法(国際公開番号:WO 01/06844)によってイネ(品種:日本晴)を形質転換した。形質転換イネ細胞の選抜は、カルベニシリン及びハイグロマイシンを含むN6Dゲルライト培地(選抜培地)で約10日毎に4回以上植え継ぐことによって、形質転換イネカルス系統(CEBiP-RNAi系統)を作出した。
- [0095] CEBiP遺伝子の発現量の解析は、抗CEBiPウサギ抗血清によるWestern Boltting分析法を用いた各イネカルスのCEBiPタンパク質やRT-PCR法によるCEBiP遺伝子の転

写量の検出により行った。具体的には、非形質転換(NT)イネカルス及び CEBiP-RNAiイネカルス各50 mgにSDS用試料溶液150  $\mu$  lを加え、100°Cで5分間加熱後、ホモジナイザーで粉碎した。遠心分離により上清部の各タンパク試料20  $\mu$  gをSDS電気泳動で分離後、PVDF膜にタンパク質を転写し、抗CEBiP抗血清でCEBiPの検出を行った。また、NTイネカルスおよび5系統のCEBiP-RNAiイネカルス(100 mg)からRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社)を用いてRNAを抽出した。得られた各RNA 100 ngをTOYOBO社のReverTra Ace- $\alpha$ -キット中のOligo(dT)<sub>20</sub>と逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、その1/4量のcDNAを鋳型に、上流側プライマー(5'-CACCCTACAGTGGTTACTCCA-3'/配列番号:16)、下流側プライマー(5'-TCCTATCTAATGAATATTCC-3'/配列番号:17)およびKOD-Plus DNAポリメラーゼ(TOYOBO社)を用いてPCRを行なった。PCRは、98°Cで10秒、45°Cで2秒、74°Cで30秒を1サイクルとし、25サイクル行なった。その後、1.5%アガロース中で電気泳動し、CEBiP遺伝子の転写産物由来のDNA断片量を確認した。コントロールとして、ユビキチン遺伝子転写産物量ならびにpANDA-CEBiP-RNAiベクター中のGUS遺伝子断片由来の転写物量も同様に確認した。ただし、GUS遺伝子用には上流側プライマー(5'-TACCCGCTTCGCGTCGGCAT-3'/配列番号:18)、下流側プライマー(5'-TGCTTCCGCCAGTGGCGCGA-3'/配列番号:19)を、ユビキチン遺伝子用には上流側プライマー(5'-CCAGTAAGTCCTCAGCCATGGA-3'/配列番号:20)、下流側プライマー(5'-GGACACAATGATTAGGGATCAC-3'/配列番号:21)を使用した。

- [0096] CEBiP遺伝子の発現量の定量は、リアルタイムPCRにより測定を行った。NTイネカルス及びCEBiP-RNAi #3と#6イネカルスから誘導した培養細胞から抽出したRNA(250ng)に、OligodTプライマーを加え、Superscript I(ニッポンジーン)により逆転写を行った試料をリアルタイムRT-PCR用テンプレートとした。リアルタイムPCRの実行は、LightCycler-FastStart DNA マスターSYBR Green I (Roche Diagnostics Japan)及びCEBiPの二種類のプライマー;上流プライマー(5'-ATGGAACGCTGAAGCTTGGTGAGA-3'/配列番号:22)と下流プライマー(5'-CTCATCCTCTAAAGAACAGAGTCA-3'/配列番号:23)を加え、LightCycler

Instrumentで分析を行った。コントロールには、イネユビキチン遺伝子転写産物量を用い、プライマーには、(5'-CCAGTAAGTCCTCAGCCATGGA-3'／配列番号:20)と(5'-GGACACAATGATTAGGGATCAC-3'／配列番号:21)を使用した。定量用PCRプログラムは、1サイクル95℃10分、45サイクル(95℃15秒、60℃5秒、72℃10秒)を用い、得られた結果をロシュ社のプロトコールに従って、ユビキチン遺伝子転写産物量で補正後それぞれ培養細胞のCEBiP含量を算出した。

[0097] その結果、抗CEBiPウサギ抗血清を用いるWestern Boltting法により、CEBiPタンパク質は4系統のCEBiP-RNAiイネ細胞(#3, #4, #6, #11)では検出されず、一方、NTおよびCEBiP-RNAi #8由来のイネ細胞で検出された(図14)。また、同様にRT-PCR法によるCEBiP遺伝子由来の転写物は、4系統のCEBiP-RNAiイネ細胞では発現が確認されず、NT及びCEBiP-RNAi #8の両イネ細胞では遺伝子の発現が見られ、Western Boltting解析の結果を支持した。遺伝子導入の指標となるGUS遺伝子断片由来の転写物は、これらの4系統のCEBiP-RNAiイネ細胞において確認され、コントロールとして用いたイネユビキチン遺伝子由来の転写物は、すべてのイネ細胞で検出された。これらの結果により、4系統の形質転換イネカルスにおいては、CEBiP遺伝子の発現量が抑制されているものと判断した。

[0098] また、リアルタイムPCRによってCEBiPの発現量を定量した結果、NTイネ細胞のCEBiPの発現量を100%としたとき、CEBiP-RNAi #3イネ細胞は6.7%、CEBiP-RNAi #6イネ細胞では2.9%であった。従って、両CEBiP-RNAiイネ細胞のCEBiP発現量は、NTイネ細胞に比べ、それぞれ93.3%、97.1%抑制されているものと考えられた(図14)。以下の実施例においては#3と#6の2種をRNAi抑制系統として用いた。

[0099] (実施例9)糖エリシターによるCEBiP-RNAiイネ培養細胞の活性酸素生成の解析  
糖エリシター処理によるNTおよびCEBiP-RNAiイネ培養細胞における活性酸素生成の解析は、以下のように行った。NTイネカルス及びCEBiP-RNAiイネカルスを30mlのN6培地の入った100ml三角フラスコに入れ、27℃で一週間培養後、裏ごしを行い、0.6mlの細胞を新しい30mlの培地に移し、さらに4日間培養した。各培養細胞を60mgあるいは100mgを2ml容チューブに入れ、1mlの新しいN6培地を加えさらに一晚培養を行った。エリシターとして、(GlcNAc)<sub>8</sub> (100ng/ml)、Pseudomonas aeruginosa由来の

リポ多糖(LPS, 50  $\mu$ g/ml, Sigma社)、(GlcNH<sub>2</sub>)<sub>7</sub> (2  $\mu$ g/ml)を用いた。NT及びCEBiP-RNAiイネ培養細胞にエリシターを加え、30分あるいは2時間処理を行った後、培地溶液25  $\mu$ lを取り、活性酸素の測定を行った。また、コントロールとして、同量の蒸留水(DW)を加え、同様な処理を行った。活性酸素の測定は、チューブに25  $\mu$ lの反応後の溶液、400  $\mu$ lの50 mMカリウムリン酸バッファー (PK, pH 7.9)、25  $\mu$ lの1.1 mM ルミノール、50  $\mu$ lの14 mM フェリシアン化カリウムを加え攪拌した後、すばやくルミノメーター (Turner Design TD-20/20, Sunnyvale, CA) にて10秒間化学発光カウントを測定した。

- [0100] (GlcNAc)<sub>8</sub> エリシターによる各イネ細胞の活性酸素生成量を調べた結果、NTイネ細胞に比べ、CEBiP-RNAiイネ細胞では、74～86%抑制されていることがわかった(図15)。一方、LPSで処理したイネ細胞では活性酸素の生成が誘導されることが最近明らかになったが(Desaki et al., unpublished)、このLPSでCEBiP-RNAi細胞ラインを処理したところ、NTイネ細胞と同様に活性酸素の誘導が見られた。LPS処理によるNTイネ細胞の活性酸素生成量を100%とした時、NTイネ細胞では(GlcNAc)<sub>8</sub> 処理により約86.3%の活性酸素の生成が見られるのに対して、2系統CEBiP-RNAiイネ細胞では60%から75%抑制されていた(図16)。また、非エリシター糖である(GlcNH<sub>2</sub>)<sub>7</sub> に対する非応答性は両CEBiP-RNAi系統においても保持されていた。これらの結果は、CEBiPが、キチンエリシターを特異的に認識する受容体としてシグナル伝達に参与する重要なタンパク質であることを強く示唆した。

- [0101] (実施例10) マイクロアレイによる解析

マイクロアレイ解析には、イネ完全長cDNAデータベースから作成されたオリゴアレイを使用した(Agilent社)。Cyanine 3(Cy3)及びCyanine 5(Cy5)標識したcRNAの調製には、(GlcNAc)<sub>8</sub> で2時間処理したNT及び2種のCEBiP-RNAiのイネ培養細胞((GlcNAc)<sub>8</sub>-NT、(GlcNAc)<sub>8</sub>-CEBiP-RNAi#3及び(GlcNAc)<sub>8</sub>-CEBiP-RNAi#6)及びコントロールとして水で処理した各培養細胞から単離したRNAを用いた。Cy3、Cy5標識方法およびCy3及びCy5標識した試料と22Kのイネオリゴプローブを貼り付けたスライドガラスとのハイブリダイゼーション方法はAgilent社のプロトコールに従って行った。ハイブリダイゼーションの試料の組み合わせは、[1]Cy5標識(GlcNAc)<sub>8</sub>-NT / Cy3標

識NT、[2]Cy5標識(GlcNAc)<sub>8</sub>-CEBiP-RNAi#3 / Cy3標識CEBiP-RNAi#3、[3]Cy5標識(GlcNAc)<sub>8</sub>-CEBiP-RNAi#6 / Cy3標識 CEBiP-RNAi#6を用い、さらにそれぞれの標識試薬をスワップした(標識体を入れ替えた)実験も行った。得られた結果は、  
<http://tos.nias.affrc.go.jp/cgi-bin/tos17/array.cgi>サイトにて解析した。

- [0102] その結果、(GlcNAc)<sub>8</sub>-NT / NT区では、746個の遺伝子の発現量が増加し、220個の発現量が減少する遺伝子が同定された(図17A)。それに対して、(GlcNAc)<sub>8</sub>-CEBiP-RNAi#6 / CEBiP-RNAi#6区では、361個の発現量が増加する遺伝子及び90個の発現量が減少する遺伝子が同定された。また、CEBiP-RNAi#6細胞では、(GlcNAc)<sub>8</sub>-NT / NT区の746個の発現量が増加する遺伝子のうち71%にあたる530個の遺伝子は、エリシター応答性が非形質転換体イネの結果に比べ2倍以上の抑制(45個)および消失し(図17A)、それらの既知遺伝子群の中で約5割が、防御、一次代謝、シグナル伝達、ファイトアレキシン合成に関わる二次代謝等に関与する遺伝子で占められていた(図17B)。
- [0103] また、それらのうち代表的な遺伝子を表1に抜粋した。CEBiP-RNAi細胞ではエリシター応答性遺伝子のうち、CEBiP遺伝子(AK073072)をはじめ、Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase (AK071482)やPAL(AK068993)などのファイトアレキシン合成関連遺伝子、シキミ酸キナーゼ(AK066687)などのシキミ酸経路関連遺伝子、1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase(AK058296)のようなエチレン生合成関連遺伝子、Laccase(AK103094)等のリグニン分解関連遺伝子、MAPK経路関連遺伝子のエリシター応答性が消失することから、これらの遺伝子群がCEBiPタンパク質の下流に存在することが示唆された。興味あることに、細胞死に関わるとみられるHarpin induced protein(Hin, AK068115, AK063651)やPirin(AK105971)の遺伝子、細胞死の負の制御遺伝子(Spl 11, AK105835)も同様にエリシター応答性を消失していることから、これらの遺伝子群が、CEBiPの下流にて制御されていることが示唆された。
- [0104] また、(GlcNAc)<sub>8</sub>-CEBiP-RNAi#6 / CEBiP-RNAi#6区のエリシター処理による発現量が増加する遺伝子361個中100個(約28%)は、NT細胞に比較して発現量が増加し(図17A)、Ribosome inactivation protein 2(AK103707)、NADPH HC toxin reductase(AK065812)、Calreticulin(AK060834)などの遺伝子が見られた(表1)。

[0105] 一方、(GlcNAc)<sub>8</sub>-NT / NT区で発現量が減少する遺伝子の80%にあたる176個の遺伝子は、(GlcNAc)<sub>8</sub>-CEBiP-RNAi#6/ CEBiP-RNAi#6区において非形質転換体の結果に比べ2倍以上の抑制及び消失し(図17A)、主としてトランスポート、転写、防御に関わる遺伝子が見られた(図17B)。さらに、216個のエリシター処理で発現量が増加する遺伝子及び44個の発現量が減少する遺伝子では、非形質転換体イネ及びCEBiP-RNAi#6イネ細胞いずれにおいても同等な遺伝子応答がみられた。発現量が増加する遺伝子の中には、NAC transcription factor(AK067690)、Small GTP-結合タンパク質(AK066784)などがあり、一方、発現量が減少する遺伝子の中には、Expansin(AK100959)及びCysteine proteinase(AK072235)が含まれていた。同様な傾向は、CEBiP-RNAi#3イネ細胞においても得られた。

[0106] [表1]



アクセッション 番号	特徴	～倍増加	
		NT*	RNAi #6
上方制御遺伝子			
AK063651	Harpin induced protein	24.7	N.D <sup>a</sup>
AK101431	Patatin-like protein	19.6	N.D
AK105971	Pirin	20.6	N.D
AK071482	Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	11.3	N.D
AK069456	Peroxidase	10.9	N.D
AK066687	シキミ酸キナーゼ	9.5	N.D
AK058296	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	6.6	N.D
AK073072	CEBiP	2.6	N.D
AK068115	Harpin induced protein	43.1	10.1
AK068993	PAL	48.4	2.9
AK103094	Laccase	10.0	2.1
AK067690	NAC Transcription factor	2.4	3.4
AK066784	Small GTP- 結合タンパク質 (rab5A)	2.1	2.5
AK103707	Ribosome inactivating protein 2	N.D	27.8
AK065812	Zea mays NADPH HC toxin reductase	N.D	16.0
AK058891	$\beta$ -1,3 glucanase	4.1	11.4
AK060834	Calreticulin	3.3	14.2
下方制御遺伝子			
AK060423	Alanine :glyoxylate aminotransferase like protein	11.2	N.D <sup>a</sup>
AK071598	Lipid transfer protein	10.0	N.D
AK060625	GDSL-motif lipase/hydrolase	6.4	N.D
AK060582	Replication protein A1(Os-RPA1)	4.6	2.8
AK102192	$\beta$ -Galactosidase	3.1	2.8
AK100959	beta-Expansin(EXPB3)	5.5	5.4
AK072235	Cysteine proteinase	4.3	5.5

<sup>a</sup> N.D, 検出せず

[0107] 一連のマイクロアレイの実験により、イネ培養細胞においてキチンオリゴ糖エリシターに応答する遺伝子のうち、7割強の遺伝子がCEBiPの発現量を低下させることによって応答性を失うことから、CEBiPはキチンオリゴ糖エリシターの受容体タンパク質であり、エリシターシグナル伝達において重要な役割をもつタンパク質であることが確認された。

#### 産業上の利用可能性

[0108] エリシターは、植物において、種々の生体防御関連遺伝子を誘導し、防御反応を引き起こすことが知られている。本発明のタンパク質はエリシターの受容体であると考えられるので、本発明のタンパク質を過剰発現させることで、種々な生体防御応答を

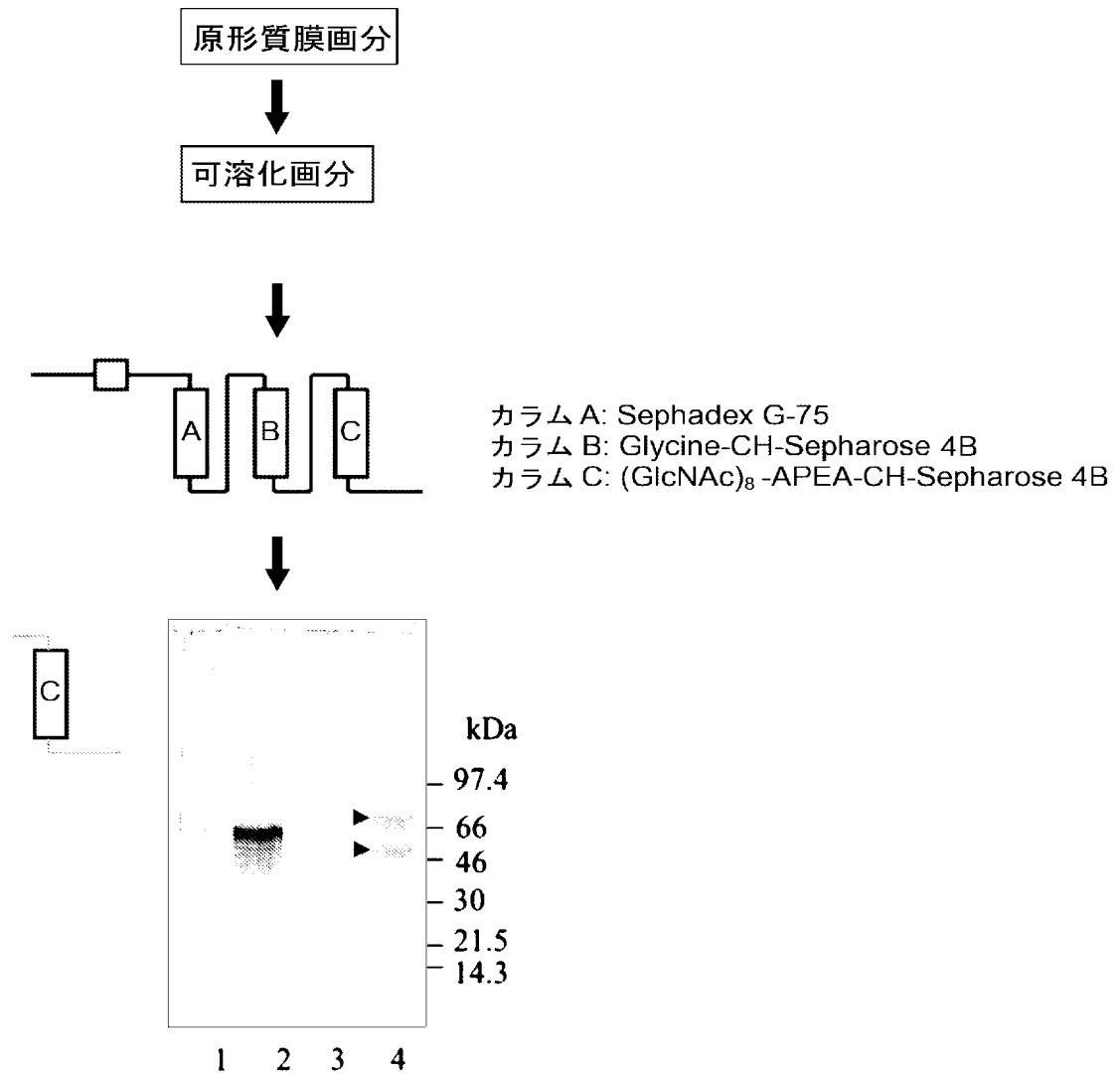
誘導できる。よって、本発明のタンパク質を用いることで、新規の、いもち病などの病害防除技術が提供されと考えられる。また、イネのみでなく多くの植物にも本発明のタンパク質と同様なタンパク質が存在する。本遺伝子情報が明らかになることで、植物が病原菌由来のシグナル分子(エリシター)を認識し、細胞内・細胞間シグナル伝達経路を経て生体防御関連遺伝子の発現を誘導するメカニズムが明らかになることも期待され、病害に強いイネを含む、多くの作物の育種の開発に寄与することが考えられる。

## 請求の範囲

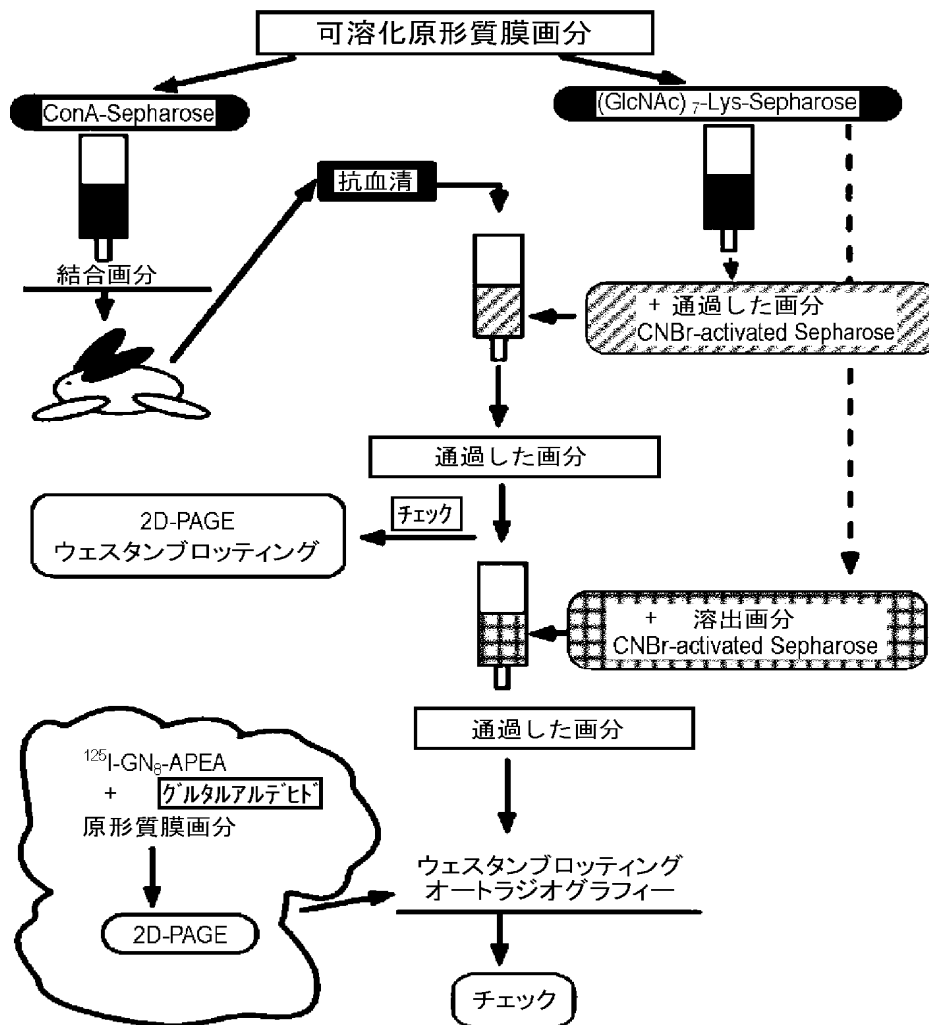
- [1] 以下の(a)～(d)のいずれかに記載の、キチンオリゴ糖エリシターに対して結合活性を有する植物のタンパク質をコードするDNA。
- (a)配列番号:1または3に記載の塩基配列からなるDNA
- (b)配列番号:1または3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNA
- (c)配列番号:2または4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA
- (d)配列番号:2または4に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA
- [2] 植物がイネである、請求項1に記載のDNA。
- [3] 請求項1または2に記載のDNAによりコードされるタンパク質。
- [4] 請求項1または2に記載のDNAを含むベクター。
- [5] 請求項1もしくは2に記載のDNA、または請求項4に記載のベクターを保持する形質転換植物細胞。
- [6] 請求項5に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体。
- [7] イネ由来である、請求項6に記載の形質転換植物体。
- [8] 請求項6または7に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。
- [9] 請求項6～8のいずれかに記載の形質転換植物体の繁殖材料。
- [10] 請求項6～8のいずれかに記載の形質転換植物体の製造方法であって、請求項1もしくは2に記載のDNA、または請求項4に記載のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法。
- [11] 請求項1もしくは2に記載のDNA、または請求項4に記載のベクターを含有する、植物の病害防除に用いる薬剤。
- [12] 植物がイネである、請求項11に記載の薬剤。
- [13] 病害がいもち病である、請求項12に記載の薬剤。
- [14] 請求項3に記載のタンパク質を植物体の細胞内で発現させることを特徴とする、植物の病害防除方法。

- [15] 植物がイネである、請求項14に記載の方法。
- [16] 病害がいもち病である、請求項15に記載の方法。

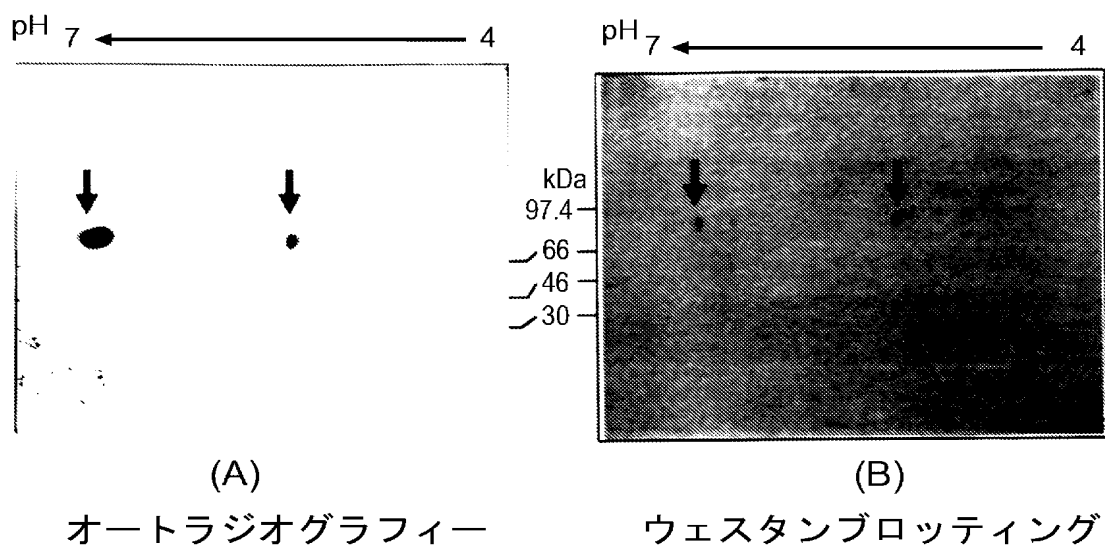
[図1]



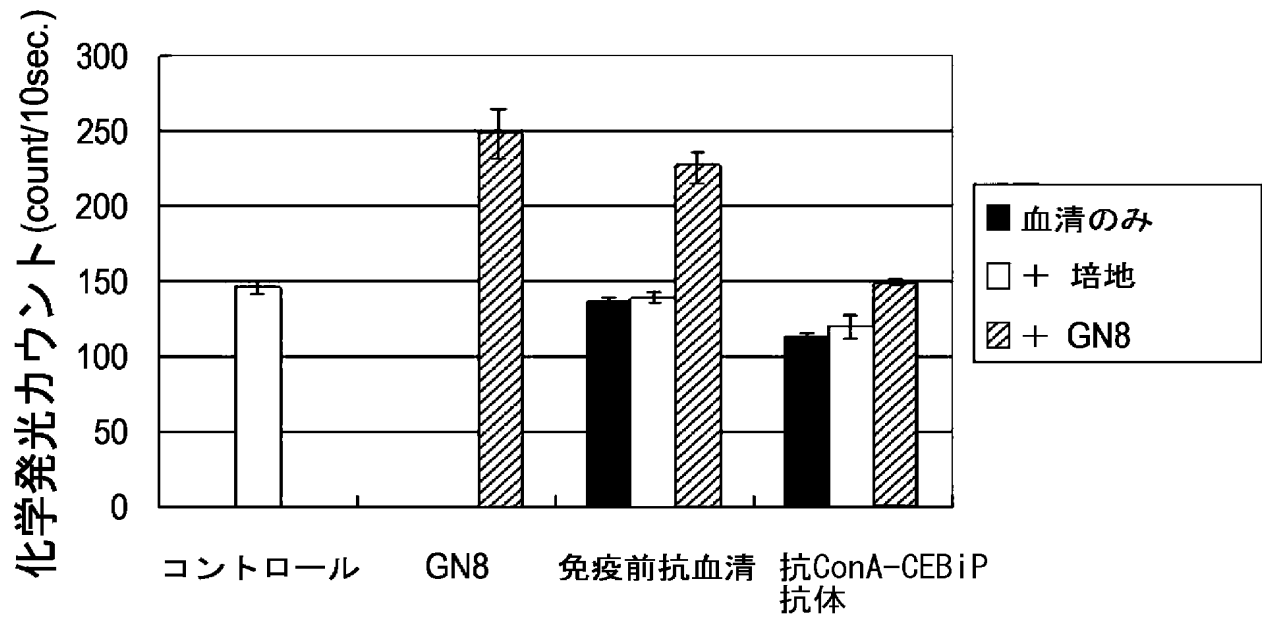
[図2]



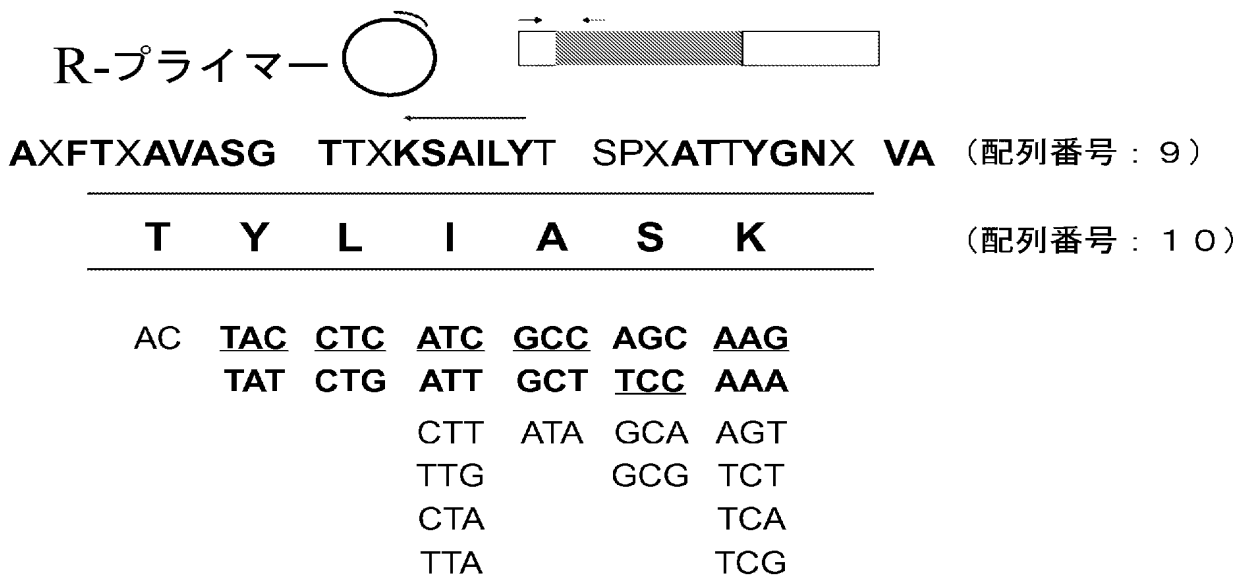
[図3]



[図4]

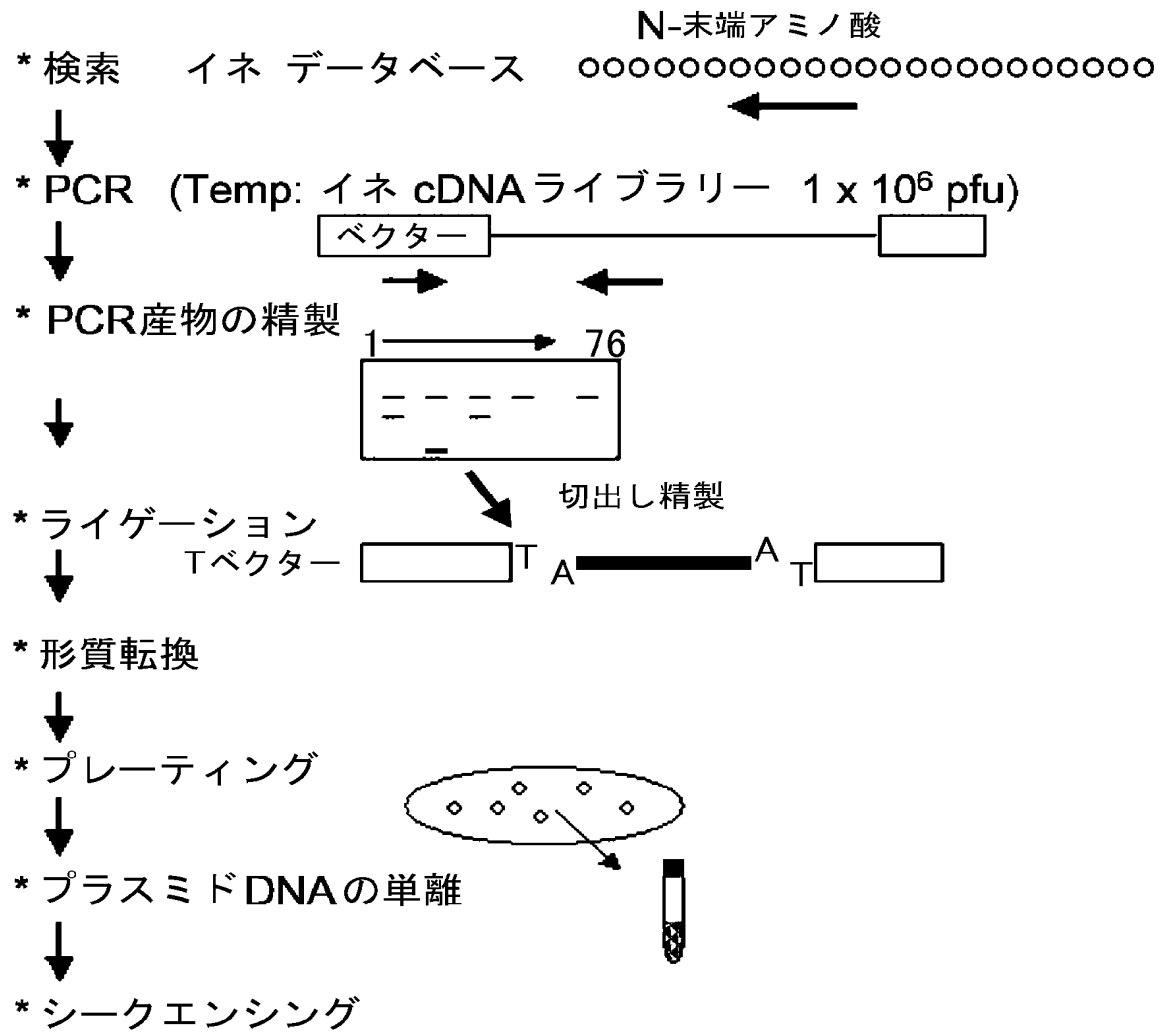


[図5]



・Temp: イネ cDNA ライブラリー (1 x 10<sup>6</sup> pfu)

[図6]

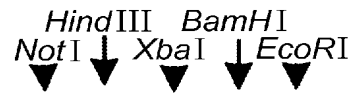




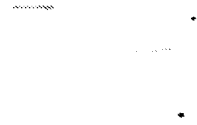
[illegible]

[図8]

*Hind*III *Bam*HI  
*Not*I ↓ *Xba*I ↓ *Eco*RI



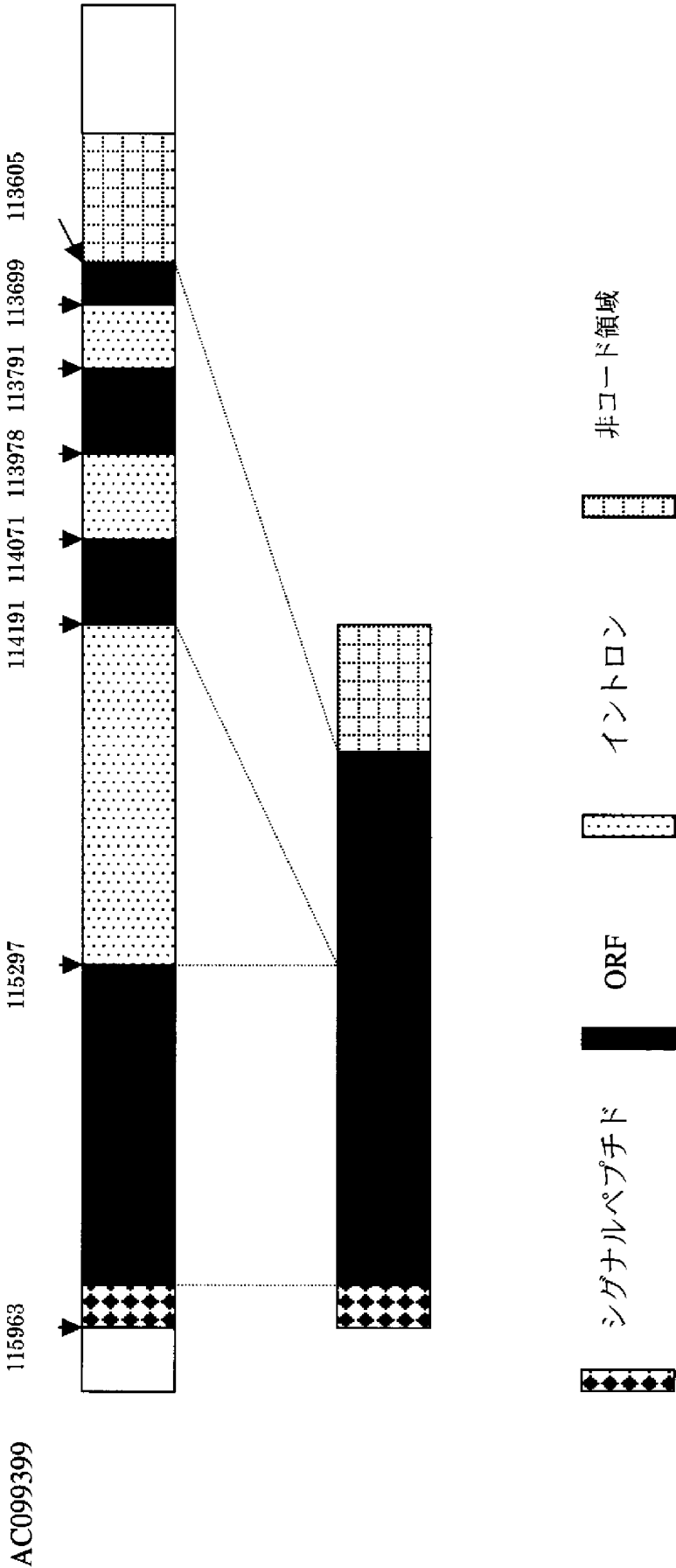
.....



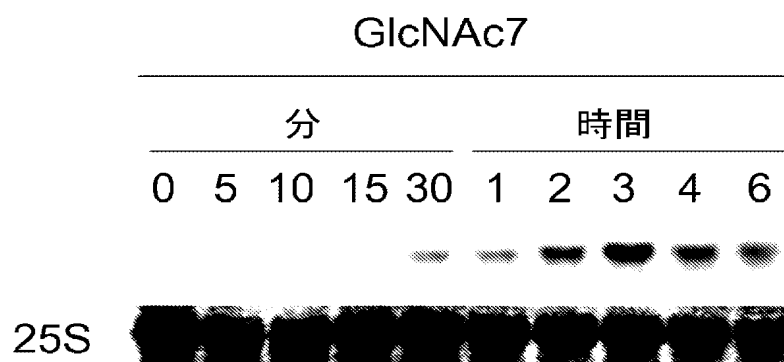
.....



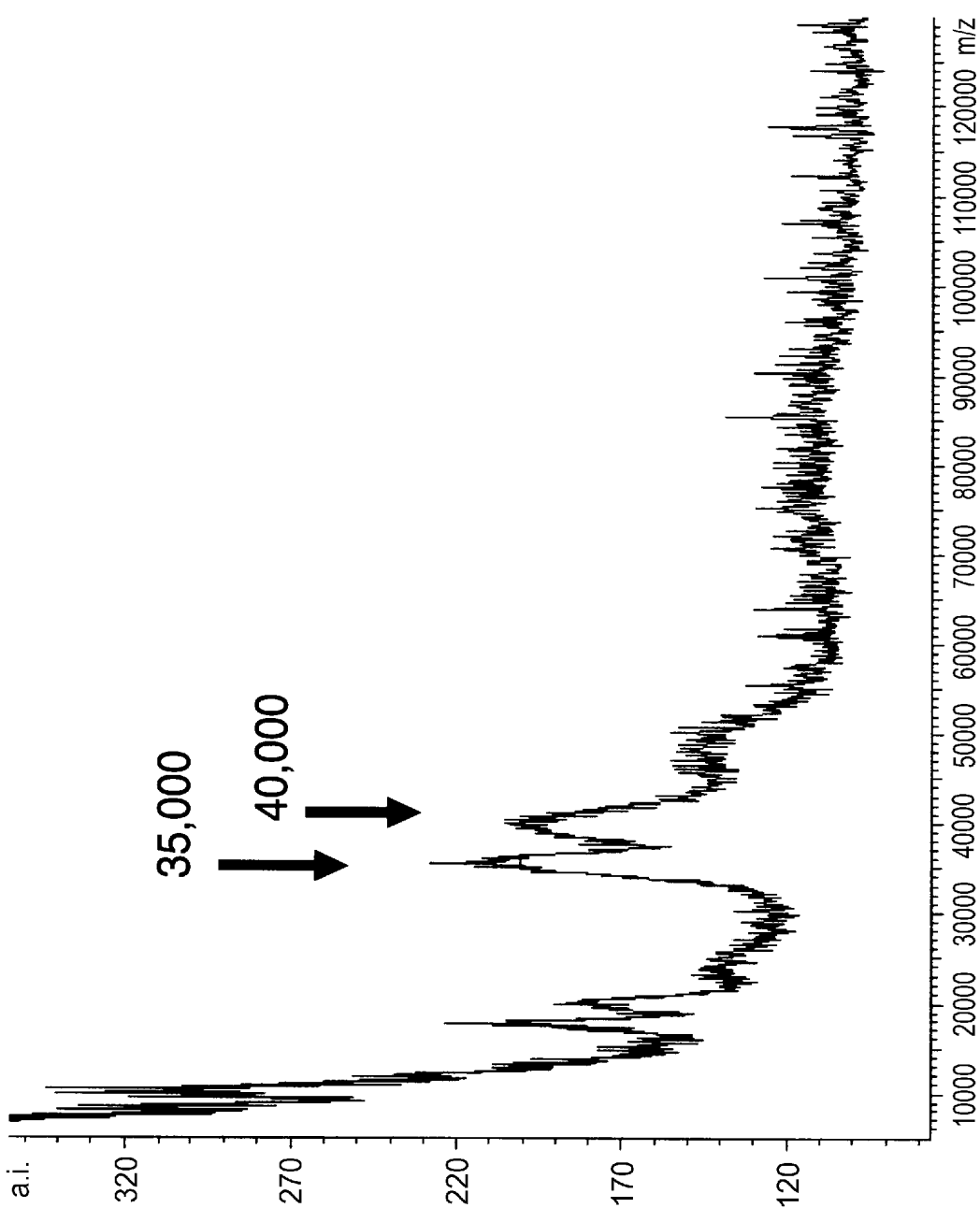
[図9]



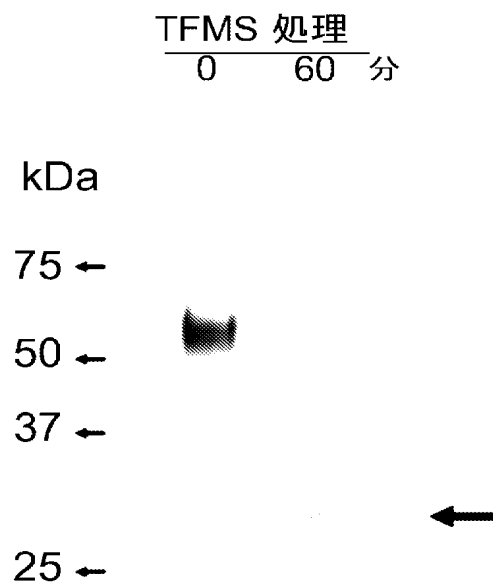
[図10]



[図11]



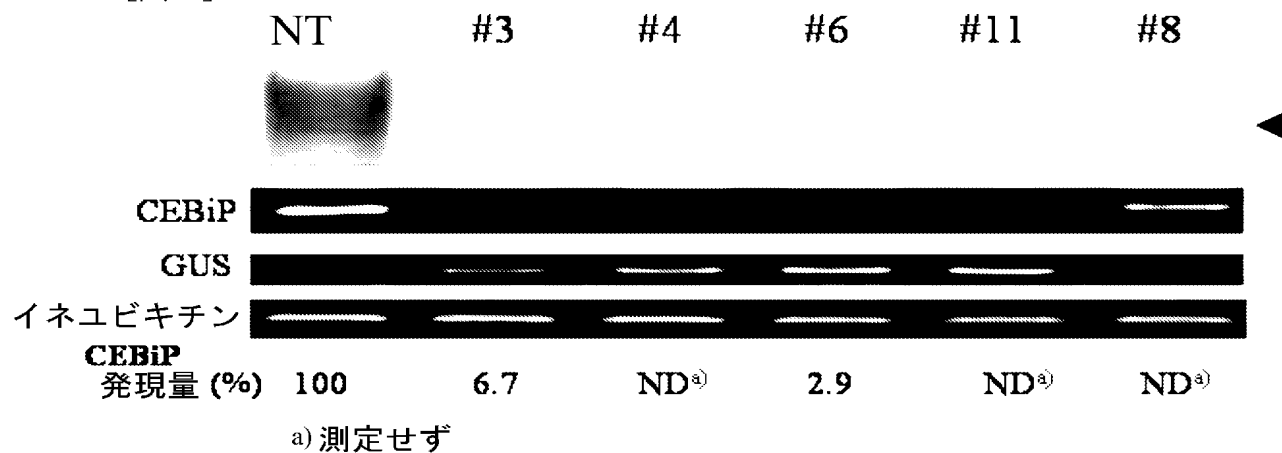
[図12]



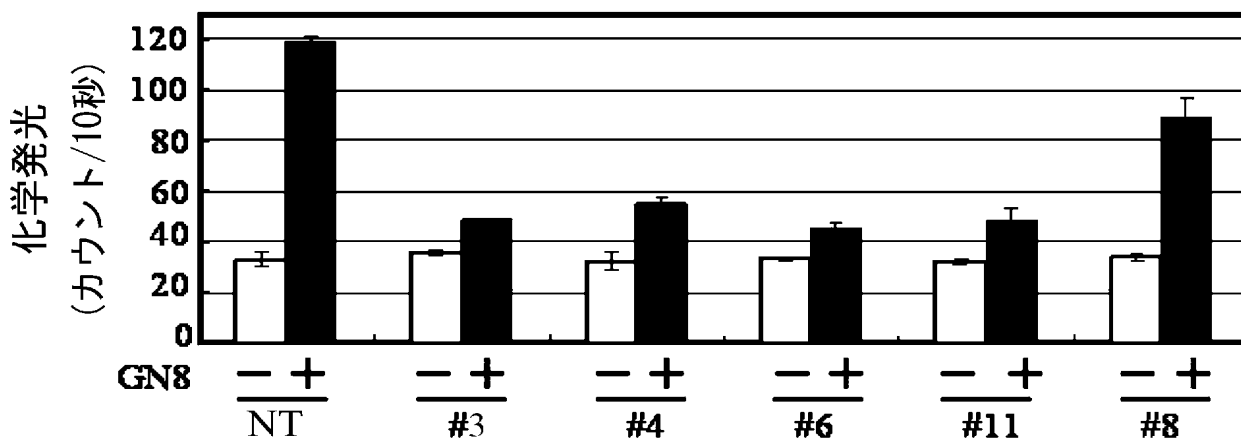
[図13]

5' -ACAGAACAAGGGATGCCCGTCAGTGCCACTGTGCAATGGAACGCTGAAGCT  
 TGGTGAGACGAACGGCACCGGTTGCGGATCAACAACGTGCGCCTACAGTGGTTA  
 CTCCAACAGTTCATCGCTCATCATAAAACCAGCCTTGCAACTAATCAGACAAC  
 AGCCTGCCAGAGAGGAGGATCTGGGAGGTCGCAGTTCGCTAGGTCCATGTGGAG  
 CATGTCTGTTATCTCCTTCCACATGGTGTTGATCATTATCTGTTTCCTTTGATG  
 TTGGAGACTACTGCAACTCTAGATGGTACATTTCAAAGAGTTCTCTACGATCTA  
 TGATTGTTGTATACGATATATGATTGTTGTCGTAACCTTAGATTTTGATGACTGG  
 TTTATCCAGC-3' (配列番号 : 13)

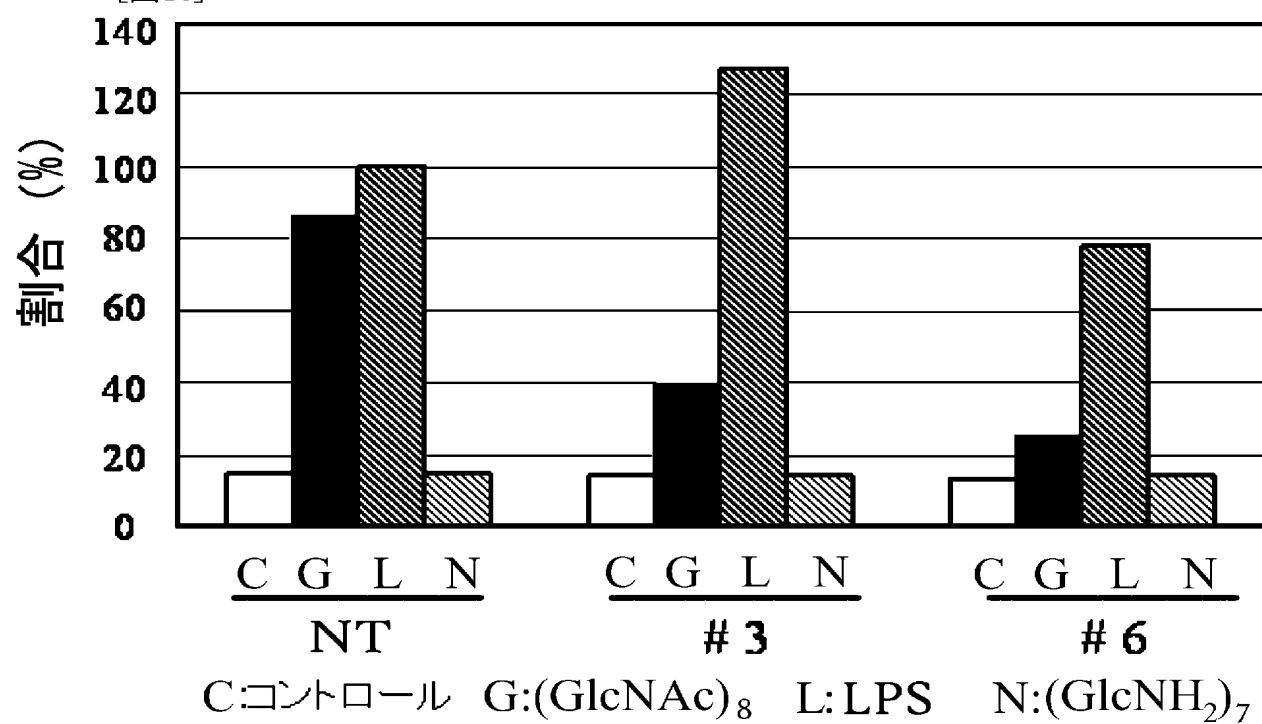
[図14]



[図15]

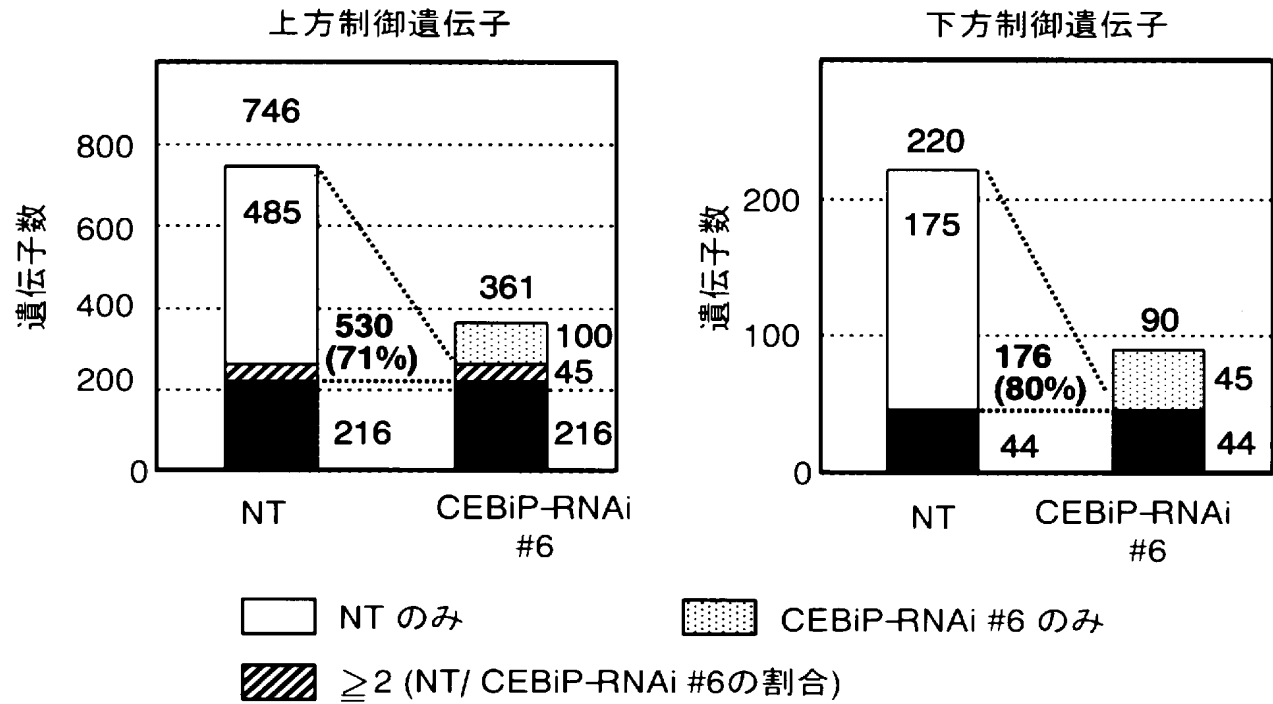


[図16]

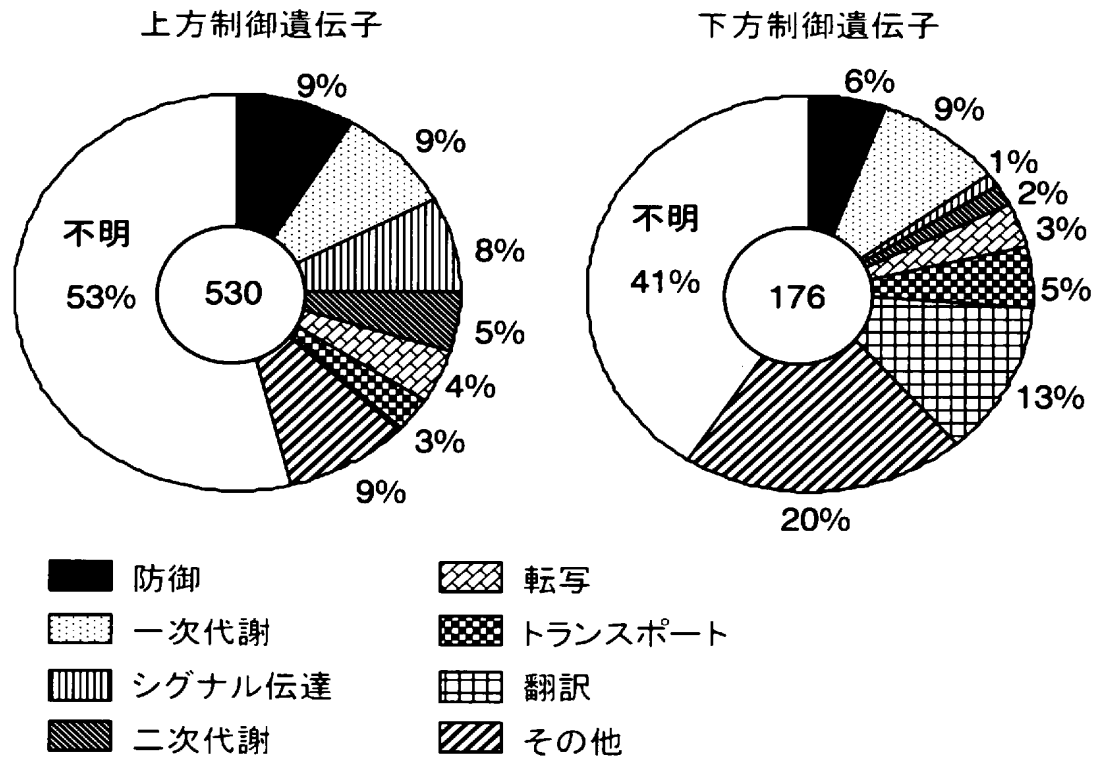


[図17]

(A)



(B)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003451

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/29, 15/84, A01H1/00, 5/00, A01N65/00, C07K14/415,  
C12N5/04, 5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/29, 15/84, A01H1/00, 5/00, A01N65/00, C07K14/415,  
C12N5/04, 5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), Medline (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/000906 A2 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG.), 03 January, 2003 (03.01.03), & EP 1399561 A2 SEQ ID: 103(24935), SEQ ID: 104(24936); examples 3 to 5; Claims 1 to 55	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April, 2005 (19.04.05)

Date of mailing of the international search report

10 May, 2005 (10.05.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003451

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Wing RA et al., "Accession: AC099399 [gi: 22450535], Definition: Oryza sativa (japonica cultivar-group) chromosome 3 clone OJ1006F06, complete sequence.", NCBI Sequence Revision History [online]; 07-SEP-2002 uploaded, NCBI, [URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?22450535:NCBI:3796311">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?22450535:NCBI:3796311</a> ] > [retrieved on 13 April, 2005 (13.04.05)], Retrieved from the Internet: <URL: <a href="http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/sutils/girevhist.cgi?val=AC099399">http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/sutils/girevhist.cgi?val=AC099399</a> >. gene="OJ1006F06.19", protein_id="AAN05509.1 (GI: 22758281)"	1-10
X	KIKUCHI, S., "Accession: AK073032 [gi: 32983055], Definition: Oryza sativa (japonica cultivar-group) cDNA clone: J023146H06, full insert sequence.", NCBI Sequence Revision History [online]; 19-JUL-2003 uploaded, NCBI, <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?32983055:OLD12:1038763">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?32983055:OLD12:1038763</a> > [retrieved on 18 April, 2005 (18.04.05)], Retrieved from the Internet: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/sutils/girevhist.cgi?val=AK073032">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/sutils/girevhist.cgi?val=AK073032</a> >.	1-10
A	ITO, Y. et al., Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling., Plant J., 1997, Vol.12, No.2, pages 347 to 356.	1-16
A	Hanae KAKU et al., "Rice Chitin Oligosaccharide elicitor Ketsugo Tanpakushitsu no Tanri Oyobi sono Idenshi no Tansaku", The Japanese Society of Plant Physiologists 2001 Nendo Nenkai Oyobi Dai 41 Kai Symposium Koen Yoshishu, 21 March, 2001 (21.03.01), page 162(F306).	1-16

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/29, 15/84, A01H1/00, 5/00, A01N65/00, C07K14/415, C12N5/04, 5/10

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/29, 15/84, A01H1/00, 5/00, A01N65/00, C07K14/415, C12N5/04, 5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,  
WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)、JSTPlus (JOIS)、Medline (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2003/000906 A2 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) 2003.01.03 & EP 1399561 A2 SEQ ID: 103(24935), SEQ ID: 104(24936), Example 3-5, Claim 1-55	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.04.2005

国際調査報告の発送日

10.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明照

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B

3 5 3 7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	<p>Wing RA et al.,            “Accession: AC099399 [gi: 22450535], Definition: Oryza sativa (japonica cultivar-group) chromosome 3 clone OJ1006F06, complete sequence.” NCBI Sequence Revision History [online]; 07-SEP-2002 uploaded, NCBI, &lt;URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?22450535:NCBI:3796311">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?22450535:NCBI:3796311</a>&gt; [retrieved on 13 April 2005] Retrieved from the Internet: &lt;URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/sutils/girevhist.cgi?val=AC099399">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/sutils/girevhist.cgi?val=AC099399</a>&gt;.            gene="OJ1006F06.19", protein_id="AAN05509.1 (GI: 22758281)"</p>	1-10
X	<p>Kikuchi S,            “Accession: AK073032 [gi: 32983055], Definition: Oryza sativa (japonica cultivar-group) cDNA clone:J023146H06, full insert sequence.” NCBI Sequence Revision History [online]; 19-JUL-2003 uploaded, NCBI, &lt;URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?32983055:OLD12:1038763">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?32983055:OLD12:1038763</a>&gt; [retrieved on 18 April 2005] Retrieved from the Internet: &lt;URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/sutils/girevhist.cgi?val=AK073032">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/sutils/girevhist.cgi?val=AK073032</a>&gt;.</p>	1-10
A	<p>Ito Y, et al.,            Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling.,            Plant J., 1997, vol. 12 no. 2, p. 347-356.</p>	1-16
A	<p>賀来華江 他、            イネキチンオリゴ糖エリシター結合蛋白質の単離及びその遺伝子の探索、            日本植物生理学会 2001 年度年会および第 41 回シンポジウム 講演要旨集、2001.03.21、p. 162 (F306).</p>	1-16